

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

**ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA  
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL**

**TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA**



## **Obtención de soportes biomiméticos para la expansión de células madre mesenquimales**

Alumna: Marta García Agost

Tutor: José Luis Gómez Ribelles

Co-tutora: Isabel Tort Ausina

Co-tutora: María Teresa Guillot Ferriols

Curso Académico: 2020/2021

Valencia, Julio 2021



## **Obtención de soportes biomiméticos para la expansión de células madre mesenquimales**

Autor: Marta García Agost  
Valencia, Julio de 2021

Tutor: José Luis Gómez Ribelles  
Co-tutora: Isabel Tort Ausina  
Co-tutora: María Teresa Guillot Ferriols

**RESUMEN:** El cultivo de células madre mesenquimales de médula ósea humanas (bMSC) sobre ciertos soportes puede inducir su diferenciación espontánea hacia uno de sus linajes. El efecto de ciertas proteínas y/o polisacáridos, componentes de la matriz extracelular de la médula ósea, puede tener también un efecto en este sentido. Esta capacidad es muy relevante de cara a ciertas aplicaciones en Ingeniería Tisular.

El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de nuevos soportes planos funcionalizados con biomoléculas relevantes en la composición de la matriz extracelular de la médula ósea, en este caso gelatina y condroitín sulfato, para el futuro análisis tanto de la adhesión como de la proliferación de bMSCs sobre dichos soportes.

La funcionalización se ha llevado a cabo mediante el método de layer-by-layer (LbL) en el que se depositan alternativamente capas de polielectrolitos cargados positiva y negativamente, policationes y polianiones, que se unen entre sí mediante interacciones electrostáticas. En particular, se han desarrollado soportes planos de ácido poli-L-láctico funcionalizados que exhiben en la superficie condroitín sulfato, o gelatina, contruidos por LbL. En el caso de la gelatina se ha empleado el alginato como contra-ion (Gel/Alg), mientras que en caso del condroitín sulfato se ha empleado el quitosano (CS/Chi) y además se han utilizado gelatina y condroitín sulfato como última combinación (CS/Gel).

Tras dicha síntesis, se ha llevado a cabo una caracterización física de dichos soportes funcionalizados para demostrar la presencia de las capas de polielectrolitos depositados. Mediante microscopía electrónica de barrido de emisión de campo se ha confirmado la presencia del recubrimiento gracias a la visualización de la topografía característica de la superficie de las capas, y mediante espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier se ha observado la presencia de los picos correspondientes a los grupos funcionales propios de dichas biomoléculas.

Se ha analizado el espesor del recubrimiento LbL gracias a microscopia de fuerza atómica, habiéndose observado un aumento de grosor a medida que se aumentaba el número de capas depositadas. Las concentraciones de biomoléculas presentes han sido calculadas mediante ensayos cuantitativos colorimétricos, y se han analizado las mojabilidades de las superficies mediante la medida del ángulo de contacto.

Se ha estudiado la proliferación de bMSC mediante ensayos de proliferación, demostrándose que el par CS/Gel estimula en mayor medida la proliferación de las bMSCs. Además del efecto de estas biomoléculas sobre la adhesión temprana de las bMSCs, caracterizando la morfología celular y adhesiones focales mediante inmunotinciones específicas del núcleo, del citoesqueleto de actina y de las adhesiones focales donde está presente la vinculina. Afirmándose una correcta adhesión celular asociada a los soportes Gel/Alg y CS/Gel a través de la existencia de células con una morfología de carácter fibroblástico.

Por todo ello, se ha logrado desarrollar soportes funcionalizados con potencial para ser empleados en el campo de la Ingeniería Tisular, en posteriores estudios de diferenciación espontánea de las bMSC.

**PALABRAS CLAVE:** Células madre mesenquimales, cultivo celular, soporte funcionalizado, biomolécula, multicapas de polielectrolitos, layer-by-layer.

## **Obtaining of biomimetic supports for the expansion of mesenchymal stem cells**

**ABSTRACT:** The culture of human bone marrow mesenchymal stem cells (bMSC) on certain supports can induce their spontaneous differentiation towards one of their lineages. The effect of certain proteins and/or polysaccharides, components of the extracellular matrix of the bone marrow, may also have an effect in this regard. This capability is very relevant for certain applications in Tissue Engineering.

The objective of this work has been the development of new flat supports functionalized with biomolecules relevant in the composition of the extracellular matrix of the bone marrow, in this case gelatin and chondroitin sulphate, for the future analysis of both the adhesion and the proliferation of bMSCs on these supports.

The functionalization has been carried out by means of the layer-by-layer method (LbL) in which layers of positively and negatively charged polyelectrolytes, polycations and polyanions are deposited alternately, which are joined together by electrostatic interactions. In particular, flat supports of functionalized poly-L-lactic acid that exhibit on the surface chondroitin sulfate, or gelatin have been developed, built by LbL. In the case of gelatin, alginate has been used as a counter-ion (Gel / Alg), while in the case of chondroitin sulfate, chitosan has been used (CS / Chi) and also gelatin and chondroitin sulfate have been used as the last combination (CS / Gel).

After this synthesis, a physical characterization of these functionalized supports has been carried out to demonstrate the presence of the polyelectrolyte's layers deposited. By field emission scanning electron microscopy the presence of the coating has been confirmed thanks to the visualization of the characteristic topography of the layers surface, and by means of Fourier transform infrared spectroscopy, the presence of the peaks corresponding to the functional groups of these biomolecules has been observed.

The thickness of the LbL coating has been analyzed thanks to atomic force microscopy, having observed an increase in thickness as the number of layers deposited increased. The concentrations of biomolecules present have been calculated by quantitative colorimetric assays, and the wettability of the surfaces have been analyzed by measuring the contact angle. The proliferation of bMSC has been studied through proliferation assays, demonstrating that the CS /Gel pair stimulates to a greater extent the proliferation of bMSC. In addition, the effect of these biomolecules on the early adhesion of bMSCs has been studied, by characterizing cell morphology and focal adhesions by specific immunostainings of the nucleus, actin cytoskeleton and focal adhesions where vinculin is present. Affirming a correct cell adhesion associated with the supports Gel/Alg and CS/Gel through the existence of cells with a fibroblastic morphology. For all these reasons, it has been possible to develop functionalized supports with the potential to be used in the field of Tissue Engineering, in subsequent studies of spontaneous bMSC differentiation.

**KEY WORDS:** mesenchymal stem cells, cell culture, functionalized support, biomolecule, polyelectrolyte multilayer, layer-by-layer.

## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría agradecer en primer lugar a mis tutores, por darme la oportunidad de realizar este trabajo y por todo lo que he aprendido gracias a ellos. A José Luís, por sus explicaciones, sus ideas, su guía y por su amabilidad. A Isa, por su cercanía, su atención y por todos sus consejos. Y a María, por todo su tiempo empleado, su paciencia conmigo y su ayuda constante. Gracias por todas esas semanas compartidas en cultivos, espero que se te solucione tu síndrome de Diógenes.

También me gustaría agradecer a todos mis compañeros del CBIT su ayuda y su paciencia en todo momento, por todo lo que me han aportado y por su cercanía, que ha hecho de mi paso por el laboratorio una experiencia de lo más agradable y entretenida. Sandra, gracias por el gato.

A José Carlos Rodríguez Hernández, Profesor Ayudante Doctor del departamento de Termodinámica Aplicada de la UPV, por su ayuda en el uso del AFM y por su amabilidad en todo momento. A Joaquín Ródenas, técnico de nuestro grupo de investigación en el CBIT, y a Ricardo Pérez, técnico de laboratorio del departamento de Termodinámica Aplicada de la UPV por su tiempo dedicado en haber diseñado e impreso las piezas para la impresora 3D. Ximo, espero tu factura por todas las dudas resueltas.

Al Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV por su ayuda en la preparación de las muestras y por permitirnos utilizar los equipos que hemos necesitado.

A mi familia, por ayudarme a crecer día a día y a creer en el trabajo duro. A mis amigos, por haberme escuchado y animado cada vez que las cosas no salían como yo quería, por estar siempre ahí.



## ÍNDICE DE CONTENIDOS

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES.....	1
1.2. LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SU EFECTO SOBRE LAS MSCs.....	2
1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE SOPORTES DE CULTIVO.....	4
1.3.1. MÉTODOS DE FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICOS.....	4
1.3.1.1. AMINÓLISIS.....	4
1.3.1.2. HIDRÓLISIS.....	5
1.3.1.3. ENLACES COVALENTES.....	5
1.3.2. MÉTODOS DE FUNCIONALIZACIÓN FÍSICOS.....	5
1.3.2.1. ADSORCIÓN.....	5
1.3.2.2. MULTICAPAS DE POLIELECTROLITOS O LAYER-BY-LAYER.....	5
1.4. FUNCIONALIZACIÓN POR LAYER-BY-LAYER.....	6
1.4.1. POLIELECTROLITOS.....	7
1.4.2. FACTORES INFLUYENTES EN EL RECUBRIMIENTO POR LBL.....	8
1.4.3. DINÁMICA DEL RECUBRIMIENTO.....	9
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>11</b>
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>12</b>
3.1. SÍNTESIS DE SOPORTES FUNCIONALIZADOS POR LAYER-BY-LAYER.....	12
3.1.1. OBTENCIÓN DE FILMS DE ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO.....	12
3.1.2. RECUBRIMIENTO LAYER-BY-LAYER.....	12
3.1.3. ENTRECRUZAMIENTO.....	14
3.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE SOPORTES FUNCIONALIZADOS POR LAYER-BY-LAYER...14	
3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM) ....14	
3.2.2. ÁNGULO DE CONTACTO.....	15
3.2.3. ESPECTROSCOPIA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)..15	
3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONDROITÍN SULFATO.....	15
3.2.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GELATINA.....	16
3.2.6. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM) .....	16
3.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA.....	17
3.3.1. EXPANSIÓN CELULAR.....	17
3.3.2. ESTERILIZACIÓN DE LOS FILMS.....	17

3.3.3. COATING DE FIBRONECTINA SOBRE LOS FILMS.....	17
3.3.4. SIEMBRA SOBRE LOS FILMS.....	18
3.3.5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	18
3.3.6. INMUNOFLUORESCENCIA DE COMPONENTES CELULARES.....	19
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	20
<b>4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
4.1. FABRICACIÓN DE LOS SOPORTES FUNCIONALIZADOS.....	21
4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA.....	23
4.2.1. FESEM.....	23
4.2.2. ÁNGULO DE CONTACTO.....	25
4.2.3. FTIR.....	26
4.2.4. CONCENTRACIONES DE GELATINA Y CONDROITÍN SULFATO.....	27
4.2.5. AFM.....	29
4.3. CULTIVOS CELULARES.....	31
4.3.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN.....	31
4.3.2. INMUNOFLUORESCENCIA DE COMPONENTES CELULARES.....	33
<b>5. CONCLUSIONES.....</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>41</b>
7.1. CÓDIGO PROTOCOLO IMPRESORA 3D.....	41
7.2. FESEM DE 5 BICAPAS.....	41
7.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁNGULO DE CONTACTO.....	42
7.4. FTIR DE 5 BICAPAS.....	42
7.5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CONCENTRACIONES DE GEL Y CS....	42
7.6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MTS PRELIMINAR.....	43
7.7. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS ENSAYOS DE MTS.....	44
7.8. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LAS ÁREAS Y CIRCULARIDADES CELULARES.....	45

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Células madre mesenquimales (MSC) con la capacidad para diferenciarse en células mesodérmicas.....	1
<b>Figura 2.</b> Representación gráfica del recubrimiento obtenido tras la realización de proceso Layer-by-Layer.....	6
<b>Figura 3.</b> Representación gráfica del resultado del proceso de aminólisis, obteniéndose un film de PLLA protonado por grupos amina.....	12
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del proceso de inmersión de los films de PLLA para la obtención de los recubrimientos LbL.....	13
<b>Figura 5.</b> Representación gráfica del proceso de entrecruzamiento entre las cadenas de polielectrolitos del recubrimiento.....	14
<b>Figura 6.</b> Imágenes de la impresora 3D Prusa i3 MK3S+ junto con sus complementos fabricados. ....	23
<b>Figura 7.</b> Imágenes tomadas mediante FESEM de los films antes y después de recubrirlos mediante LbL con 10 bicapas.....	24
<b>Figura 8.</b> Imágenes tomadas mediante FESEM de los films recubiertos con o sin filtrar.....	25
<b>Figura 9.</b> Fotografías de las gotas de agua Milli-Q depositadas y sus respectivos ángulos de contacto resultantes.....	26
<b>Figura 10.</b> Ángulos de contacto de muestras de 10 bicapas.....	26
<b>Figura 11.</b> Espectro FTIR de muestras de 10 bicapas.....	27
<b>Figura 12.</b> Concentraciones de CS medidas en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en muestras de 10 bicapas.....	28
<b>Figura 13.</b> Concentraciones de Gel medidas en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ en muestras de 10 bicapas.....	29
<b>Figura 14.</b> Representación 3D de las imágenes tomadas por AFM de las superficies.....	29
<b>Figura 15.</b> Imágenes tomadas en 2D por AFM junto con sus correspondientes representaciones gráficas de las alturas.....	30
<b>Figura 16.</b> Proliferación celular medida mediante MTS sobre soportes.....	32
<b>Figura 17.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a soportes de PLLA con recubrimiento CS/Chi.....	32
<b>Figura 18.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a las diferentes inmunotinciones realizadas sobre muestra Gel/Alg.....	34
<b>Figura 19.</b> Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a las diferentes inmunotinciones realizadas sobre muestra CS/Gel.....	34
<b>Figura 20.</b> Box and whiskers (Percentil 10-90) de las áreas de las células adheridas a los diferentes soportes.....	35

<b>Figura 21.</b> Box and whiskers (Percentil 10-90) de las circularidades de las células adheridas a los diferentes soportes.....	36
<b>Figura 22.</b> Imagen del código diseñado para ejecutar los movimientos de la impresora 3D correspondiente a 1 bicapa de recubrimiento.....	41
<b>Figura 23.</b> Imágenes tomadas mediante FESEM de los scaffolds antes y después de recubrirlos mediante LbL con 5 bicapas.....	41
<b>Figura 24.</b> Espectro FTIR de muestras de 5 bicapas.....	42
<b>Figura 25.</b> Proliferación celular medida mediante MTS sobre soportes.....	44

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Medidas del grosor de los soportes de PLLA previo a su funcionalización.....	21
<b>Tabla 2.</b> Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9 del ángulo de contacto.....	42
<b>Tabla 3.</b> Resultados del análisis estadístico t test desarrollado por el software GraphPad Prism 9 de la concentración de gelatina.....	43
<b>Tabla 4.</b> Resultados del análisis estadístico de t test desarrollado por el software GraphPad Prism 9 de la concentración de condroitín sulfato.....	43
<b>Tabla 5.</b> Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos del MTS a 24 horas.....	44
<b>Tabla 6.</b> Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos del MTS a 3 días.....	45
<b>Tabla 7.</b> Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos del MTS a 7 días.....	45
<b>Tabla 8.</b> Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos de las áreas celulares de cada muestra..	45
<b>Tabla 9.</b> Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos de las circularidades celulares .....	46

## ABREVIATURAS

ALG: alginato  
AFM: microscopia de fuerza atómica  
BCA: ácido bicinconínico  
BMP: proteínas morfogenéticas óseas  
bMSC: células madre mesenquimales de médula ósea  
BSA: albumina de suero bovino  
CHI: quitosano  
CS: condroitín sulfato  
DC: células dendríticas  
DAPI: 4',6-diamino-2- fenilindol  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagles Medium  
DMEM-LG: Dulbecco's Modified Eagles Medium Low Glucose  
DMEM-HG: Dulbecco's Modified Eagles Medium High Glucose  
ECM: matriz extracelular  
EDC: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida  
DPBS: Dulbecco's Phosphate Buffered Saline  
FBS: suero fetal bovino  
FCS: suero fetal de ternero  
FESEM: microscopio electrónico de barrido de emisión de campo  
FN: fibronectina  
FTIR: espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier  
GAGs: glicosaminoglicanos  
GEL: gelatina  
HEPES: ácido 4-(3-hidroxietil) piperazina-1- etanosulfónico  
HSC: células madre hematopoyéticas  
LbL: layer-by-layer  
LPM: mesoderma de placa lateral somático  
MM: mieloma múltiple  
MSC: células madre mesenquimales  
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3- carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium  
NBCS: suero de ternero recién nacido  
NHS: N-hidroxisuccinimida  
PEI: polietilenimina  
PLLA: ácido poli-L-láctico  
pK<sub>a</sub>: constante de disociación ácida  
P/S: Penicilina/estreptomicina  
RGD: arginina glicina y aspartato  
RPMI: Roswell Park Memorial Institute  
TGF-  $\beta$ : factor de crecimiento transformante  $\beta$   
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

## 1. INTRODUCCIÓN

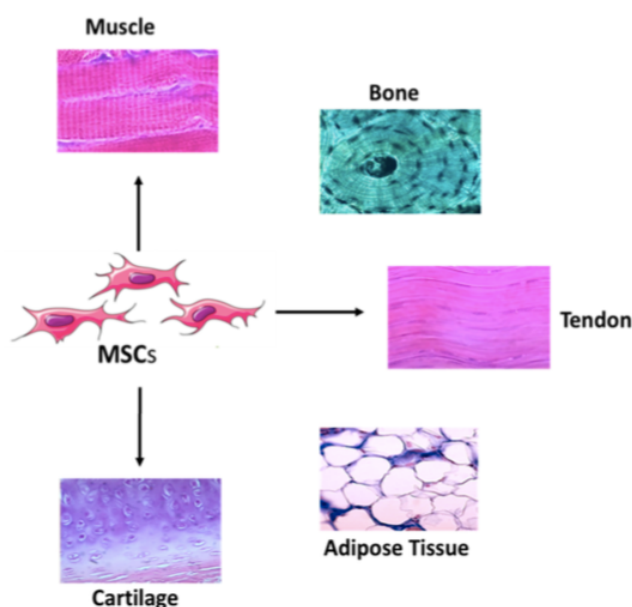
### 1.1. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES

Las células madre mesenquimales (MSC, de su nombre en inglés Mesenchymal Stem Cells) son aquellas células multipotentes estromales con origen en el mesodermo y en las crestas neurales (Kangari *et al.*, 2020). Pueden ser aisladas de gran variedad de tejidos como son la médula ósea, tejido adiposo, músculo, hígado fetal, cordón umbilical, pólipos endometriales, tejido dental, fluido sinovial, piel y leche materna, entre muchos otros (Ullah *et al.*, 2015). Se caracterizan por ser células plásticas adherentes con morfología de fibroblasto cuando se cultivan, además de expresar marcadores específicos de superficie mesenquimales tales como CD73, CD90 y CD105 (Kangari *et al.*, 2020).

El concepto fue introducido por primera vez por Alexander Friedenstein hace medio siglo, describiendo una población de células derivadas de la médula ósea que eran diferentes a la población de células madre hematopoyéticas (HSC) y que además eran osteogénicas *in vivo* y clonogénicas *in vitro*. Posteriormente, se demostró la capacidad de estas mismas células de renovarse, formar colonias y diferenciarse *in vitro* (Sheng, 2015).

Las MSCs cuentan con la capacidad de diferenciarse tanto en células del mesodermo, tales como osteoblastos, adipocitos y condrocitos (figura 1); como del ectodermo, en el caso de células neurales; y del endodermo, como hepatocitos (Kangari *et al.*, 2020).

Los tres tipos celulares de origen mesodérmico tienen en común su formación por el mesodermo de placa lateral somático (LPM), pero se ha de tener en cuenta que no todas las células asociadas a las MSCs tienen dicho origen, ya que las crestas neurales de las que también provienen las MSCs tienen origen ectodérmico, por ejemplo (Sheng, 2015).



**Figura 1. Células madre mesenquimales (MSC) con la capacidad para diferenciarse en células mesodérmicas** (Mills *et al.*, 2020).

Estas células tienen una serie de papeles distintivos *in vivo* como son el potencial de diferenciación, la secreción de factores tróficos y las propiedades inmunoregulatoras. Secretan factores de crecimiento y citoquinas, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF),

el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interleuquinas, con lo que logran sus efectos paracrinós (Kangari *et al.*, 2020). Estas sustancias son secretadas una vez las MSCs alcanzan tejidos dañados e interactúan con estímulos locales, como la hipoxia o las citoquinas inflamatorias, con el fin de reparar estos tejidos y regenerarlos (Fernandez and Fernandez, 2016).

Además, cuentan con la habilidad de modular la respuesta inmune gracias a la represión de la proliferación inadecuada de células T, la maduración de células dendríticas (DC), la activación de células B y la activación de la respuesta citotóxica mediante células NK (Kangari *et al.*, 2020). Esta función la pueden realizar a través del contacto célula-célula y/o a través de la secreción de factores, pudiéndose agrupar sus funciones inmunomoduladoras en tres grupos: siendo hipoinmunogénica, modulando el fenotipo de células T e inmunosuprimiendo el ambiente (Fernandez and Fernandez, 2016).

Las MSCs suelen ser aisladas basándose en su capacidad de adhesión a las superficies plásticas, usándose un método de gradiente de densidad de Ficoll con su posterior sembrado en placa. Llegan a ser cultivadas *in vitro* en 8-15 pases, esto corresponde a 25-40 duplicaciones de población (Fernandez and Fernandez, 2016). Para ello se usan diferentes medios de cultivo como DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium), DMEM-F12,  $\alpha$ MEM, DMEM-LG (Low Glucose), DMEM-HG (High Glucose) y RPMI (Roswell Park Memorial Institute). El medio de cultivo principal se suplementa con 10% de suero fetal bovino (FBS), suero fetal de ternero (FCS) o suero de ternero recién nacido (NBCS). La concentración de oxígeno, además del medio y sus suplementos, también afecta a la capacidad proliferativa de estas células (Ullah *et al.*, 2015). Uno de los retos más importantes en el cultivo de dichas células madre es lograr obtener un número adecuado de células, ya que éstas pierden sus capacidades proliferativas y entran en senescencia tras varios pases debido a la disminución de la actividad telomérica. Independientemente, si se cultivan durante largos períodos de tiempo también llegan a mutar y disminuye su multipotencialidad, por lo que células más tempranas cuentan con capacidades de diferenciación mayores (Ullah *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que pueden mantenerse indiferenciadas al ser cultivadas en soportes tridimensionales hechos de geles naturales e hidrogeles basados en alginato, gelatina, agarosa, colágeno, quitosano, ácido hialurónico y glicosaminoglicanos (GAGs) (Kangari *et al.*, 2020). En cambio, si se quiere provocar su diferenciación a líneas mesodérmicas, se emplean medios y suplementos específicos. La diferenciación a adipocitos se induce gracias a suplementar al medio de crecimiento con dexametasona, indometacina, insulina e isobutil-metil-xantina durante 3 semanas. Para su diferenciación a osteocitos, se cultivan las células con ácido ascórbico,  $\beta$ -glicerofosfato y dexametasona durante 3 semanas, con el objetivo de lograr la expresión de factores de diferenciación osteogénica como son las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), como BMP2 o BMP6. Y para llegar a condrocitos, el medio DMEM se suplementa con insulina-transferrina-selenio, ácido linoleico, ácido selenoso, piruvato, ascorbato 2-fosfato, dexametasona y factor de crecimiento transformante  $\beta$ -I o  $\beta$ -III (TGF- $\beta$ I o TGF- $\beta$ III) (Ullah *et al.*, 2015).

## **1.2. LA MATRIZ EXTRACELULAR Y SU EFECTO SOBRE LAS MSCs**

La matriz extracelular (ECM) es el componente celular que se encuentra en la totalidad de los tejidos conectivos y que, dependiendo del tejido al que pertenezca, tendrá una composición determinada. Está formado por agua y una red tridimensional altamente organizada y compleja de biomoléculas secretadas por las células entre las que se pueden encontrar los GAGs y las proteínas fibrilares, como el colágeno. Las proteínas se encargan de proporcionar la estabilidad y la resistencia a los esfuerzos de los tejidos donde se hallan. En cuanto a los



glicosaminoglicanos, son polisacáridos polianiónicos cuya función es la de relleno, proporcionando así una hidratación y lubricación a los tejidos (Assunção *et al.*, 2020).

La ECM proporciona un microambiente que estimula comportamientos celulares como la adhesión celular, migración, proliferación y diferenciación, entre otros. Estas actividades celulares pueden ser reguladas por diferentes métodos, como la unión de las proteínas de la ECM a los receptores celulares (integrinas), la respuesta celular generada a los estímulos mecánicos como la elasticidad de la matriz, y la presencia en la matriz de citoquinas y factores de crecimiento que regularán las actividades celulares (Carvalho *et al.*, 2019).

El cultivo de las MSCs requiere de un microambiente especializado que mantenga su capacidad de proliferación, manteniendo al mismo tiempo su multipotencia, y que, en ocasiones, favorezca su diferenciación en respuesta a determinadas señales. Este microambiente normalmente cuenta con componentes de la matriz celular, células accesorias y factores de transcripción (Chen *et al.*, 2007).

*In vivo*, las MSCs residen dentro de las grietas de huesos sumergidos en sangre y entre varios tipos de células con las que se relacionan intensamente. En concreto, la médula ósea que alberga las MSCs, contiene una gran variedad de componentes concretos como son distintos tipos de células (células hematopoyéticas, células estromales, adipocitos, elementos vasculares y células nerviosas simpáticas) rodeadas de elementos fibrosos generados por las células estromales, colágeno I, III, IV, V y VI, fibronectina, laminina y otras proteínas de adhesión, además de proteoglicanos y glicosaminoglicanos de alto peso molecular como sindecano, perlecán, ácido hialurónico y miembros de la familia de los proteoglicanos pequeños ricos en leucina incluyendo biglicano y decorina (Chen *et al.*, 2007).

En las aproximaciones *in vitro*, pese a que lo más común para su cultivo ha sido el uso de proteínas de la matriz que favorecen la adhesión celular y la diferenciación, como el colágeno, la fibronectina o la laminina, este uso exclusivo de las proteínas no reproduce fielmente la composición, la función, la microestructura, y la arquitectura deseada de la ECM nativa. Por ello, la síntesis de una matriz sobre un soporte sintético puede facilitar las actividades celulares al combinar las señales biológicas con un soporte mecánico adecuado (Carvalho *et al.*, 2019). Además, los GAGs poseen características como la no toxicidad, biodegradabilidad, citocompatibilidad y capacidad para realzar la adhesión y el crecimiento de las células de mamífero, que hacen a estas biomoléculas excelentes candidatos para ser usados como biomateriales y así imitar las propiedades bioquímicas y biomecánicas de la ECM (da Câmara *et al.*, 2019).

Con este fin, en el campo de la ingeniería tisular, se llevan a cabo distintas estrategias, como la funcionalización de soportes de cultivo con determinadas proteínas que se unan específicamente con receptores celulares; la adición de factores de crecimiento que favorezcan la adhesión, proliferación y promuevan la diferenciación; o la variación de las propiedades mecánicas de los biomateriales, como la elasticidad o la rigidez, que también influyen en la actividad celular (Mills *et al.*, 2020).

Las propiedades mecánicas del soporte del cultivo son fundamentales para su implantación y su eficacia *in vivo* (Silva *et al.*, 2013). Dado que la topografía y la química superficial afectan a la adhesión celular y a la proliferación, las propiedades mecánicas del soporte de cultivo como son la capacidad de adsorción de agua, rugosidad, rigidez, carga superficial y composición química, son cruciales para asegurar la viabilidad celular. Así, todas estas propiedades del soporte pueden ser modeladas con el propósito de proveer un ambiente que se asemeje al de la ECM de las MSCs para con ello optimizar su respuesta celular (da Câmara *et al.*, 2019).

Por ello, muchos estudios han analizado la influencia de cultivar MSCs sobre soportes sintéticos que presentan tanto proteínas como GAGs. El equipo de Yang *et al.* (2009) realizó un estudio analizando a las MSCs cultivadas en soporte plano de gelatina, como proteína, y alginato, como GAG, tanto *in vitro* como *in vivo*. Las MSCs se adhirieron y proliferaron adecuadamente tanto *in vivo* como en la implantación *in vitro* de los soportes y además su capacidad de renovación fue similar en ambos ambientes (Yang *et al.*, 2009). En el estudio realizado por Pacelli *et al.* (2018) también se estudió la respuesta de las MSCs al ser cultivadas por estas mismas biomoléculas, y se pudo comprobar la eficacia de los soportes favoreciendo la adhesión y la proliferación celular, debido a que las MSCs mostraban una morfología alargada en forma de huso propia de células adheridas al sustrato de manera adecuada (Pacelli *et al.*, 2018).

### **1.3. FUNCIONALIZACIÓN DE SOPORTES DE CULTIVO**

Los soportes de cultivo pueden obtenerse a partir de materiales naturales o sintéticos. Los biomateriales de origen natural, como el colágeno, la gelatina, el quitosano, se suelen usar como soportes, pero tienen la limitación de que varían mucho de lote a lote y es difícil procesarlos para modular sus propiedades físicas y superficiales. En cambio, los sintéticos, como el ácido poli-L-láctico (PLLA), son más reproducibles, se puede diseñar su microestructura de forma muy versátil y adaptar sus propiedades a lo que se requiera en el cultivo. Una limitación es que no presentan secuencias que las células sean capaces de reconocer por lo que imitan en menor medida el nicho de las células que los biomateriales de origen natural (Richbourg *et al.*, 2019).

Las células se unen a través de sus receptores de integrinas a las biomoléculas de la ECM, reconociendo específicamente secuencias que harán que se adhieran a la superficie. Los materiales naturales suelen proveer los componentes de la ECM que tienen dichas secuencias que son requeridas para la adhesión celular y para proporcionar un ambiente favorable. Por ello, la presencia de biomoléculas en el soporte de cultivo juega un papel esencial en la promoción de las funciones celulares, y para lograr su presencia en los soportes de cultivo sintéticos podemos funcionalizar la superficie de estos (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020). La funcionalización de superficies hidrofóbicas se puede realizar por métodos físicos y químicos.

#### **1.3.1. MÉTODOS DE FUNCIONALIZACIÓN QUÍMICOS**

Logran una superficie hidrofílica mejorada gracias a la modificación de átomos o moléculas por reacciones químicas. Una vez se modifica la superficie, permanece siempre modificada por la creación de enlaces covalentes estables entre la superficie de cultivo y las biomoléculas. Para ello se requieren dos pasos: exponer al exterior grupos funcionales como -OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH, que se requieren para las reacciones; y la formación de los enlaces covalentes entre estos grupos funcionales de la superficie y las biomoléculas (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020). Hablamos aquí sólo de alguno de estas rutas de síntesis más relacionadas con nuestro trabajo.

##### **1.3.1.1. AMINÓLISIS**

Incorpora grupos amina libres a la superficie, gracias a la formación de enlaces covalentes entre el grupo específico de la superficie y el grupo amina del otro extremo de la diamina usada para la funcionalización. Esta diamina puede ser 1,6-hexanodiamina o etilendiamina entre otras. La reacción se debe realizar en condiciones muy controladas de concentración de diamina, temperatura, pH y tiempo. Se puede usar como tratamiento único en la funcionalización, pero normalmente se usa como intermediario a un paso de inmovilización proteica de factores de crecimiento, colágeno, etc (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020).

#### **1.3.1.2. HIDRÓLISIS**

En general, adhiere los enlaces éster a grupos -OH y -COOH en la superficie. Puede ser hidrólisis ácida o básica, que como la aminólisis requieren condiciones muy controladas y además sirve como paso intermedio a la inmovilización proteica.

La ácida usa ácidos orgánicos, como el ácido acético o el ácido láctico, y ácidos minerales, como  $\text{H}_2\text{SO}_4$  o  $\text{HCl}$ . En resumen, se forman grupos -OH, -COOH y -R-O-R' como resultado del desglose de los grupos -OOH por unión al  $\text{O}_2$  del  $\text{H}_2\text{O}$ .

En la básica, más comúnmente elegida, se emplean hidróxidos metálicos alcalinos como  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$ . El  $\text{OH}^-$  reacciona con los grupos de la superficie C-O, C-O-C y C=O, generando grupos hidrofílicos como -COOH y -OH (Richbourg *et al.*, 2019).

#### **1.3.1.3. ENLACES COVALENTES**

Se funcionaliza la superficie mediante la activación química previa de los reactivos de la superficie tratada y la posterior unión covalente con la biomolécula deseada, tales como colágeno, hidroxiapatita, quitosano o fibrina (Oliveira *et al.*, 2015). Se emplea el enlace covalente en el entrecruzamiento de biomoléculas a una superficie, provocando la unión covalente entre una molécula deseada con un grupo funcional colgante en la superficie. De esta manera funciona el entrecruzamiento de carbodiimida, en el que se permite unir los grupos amina generados en la superficie del soporte con grupos carboxilo de las biomoléculas que se pretenden unir covalentemente, o al revés (Richbourg *et al.*, 2019).

### **1.3.2. MÉTODOS DE FUNCIONALIZACIÓN FÍSICOS**

Son una alternativa a los métodos químicos ya que permiten superar las desventajas de estos. No modifican las propiedades mecánicas de la superficie, el proceso no debe ser controlado exhaustivamente y hay ausencia de riesgos de degradación hidrolítica. Además, no requieren reactivos tóxicos, lo que permite que el método no produzca trazas de reactivos remanentes en la muestra que puedan llegar a liberarse durante el cultivo y ser citotóxicos pese a los procesos de purificación. Por otro lado, están basados en interacciones físicas, como interacciones electrostáticas, que normalmente son inestables y temporales (Oliveira *et al.*, 2015).

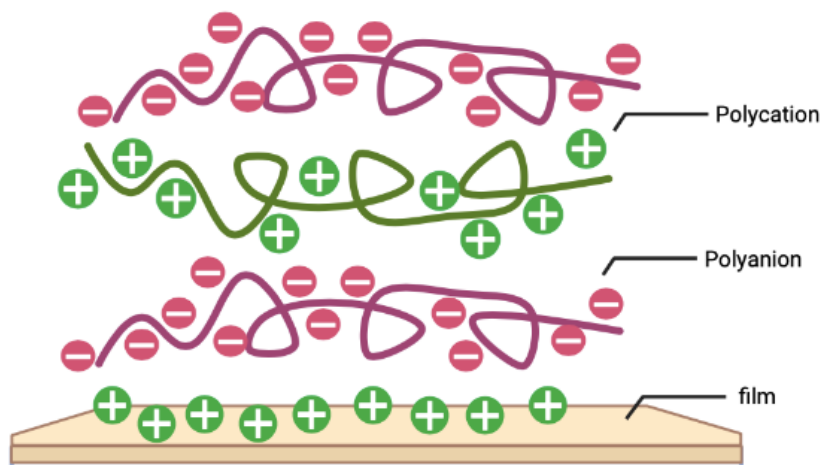
#### **1.3.2.1. ADSORCIÓN**

Se rocía o se sumerge el soporte en una solución de la biomolécula deseada. Por tanto, se produce la adhesión de esta biomolécula a la superficie por fuerzas electrostáticas, hidrofóbicas o de van der Waals. En estos procedimientos se usan una gran variedad de soportes, siendo el elegido para este trabajo el PLLA, y las biomoléculas adsorbidas suelen ser proteínas, polisacáridos o factores de crecimiento. Este tipo de funcionalización mejora la capacidad celular de reconocer los receptores de la superficie e incrementa su adhesión a la superficie modificada. Su limitación, como se ha mencionado anteriormente, es su temporalidad, dado que las fuerzas de unión se rompen con la simple adición de solventes polares (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020).

#### **1.3.2.2. MULTICAPAS DE POLIELECTROLITOS O LAYER-BY-LAYER**

El layer-by-layer (LbL) es un tipo específico de funcionalización física que se basa en el principio de la adsorción de biomoléculas de carga opuesta. De este modo, se depositan alternativamente las capas de polielectrolitos de carga opuesta, logrando así un revestimiento auto-ensamblado con las propiedades deseadas. Las capas de polielectrolitos suelen ser de materiales naturales, como proteínas o polisacáridos, que son cargadas positiva o negativamente según el pH de la

disolución. Así, mayoritariamente se producen interacciones electrostáticas entre los polielectrolitos cargados positiva y negativamente durante la deposición sucesiva, como puede observarse en la figura 2. En algunos casos, la unión también se puede producir por otros tipos de interacciones como los puentes de hidrógeno (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020).



**Figura 2. Representación gráfica del recubrimiento obtenido tras la realización de proceso Layer-by-Layer.** Ilustración creada con Biorender.com

Para aplicar las capas suelen usarse tres métodos: inmersión, centrifugado y pulverización. La más usada, y la empleada en este trabajo, es la primera. Los polielectrolitos se encuentran en disolución y se va sumergiendo al soporte en un orden determinado tantas veces como capas se quiera generar. Dado que los reactivos se encuentran en disolución, hay poca pérdida de estos, al contrario que el resto de los métodos de aplicación. Los polielectrolitos escogidos para las capas catiónicas suelen ser aquellos con exceso de grupos amina, que en medio ácido se protonan formando grupos  $\text{NH}_3^+$ ; la elección de los aniónicos puede variar, pero siempre poseerán una ratio positivo electrón-protón debido a su carga negativa (Keeney *et al.*, 2015).

En este trabajo se ha escogido este tipo de método de funcionalización debido a sus múltiples ventajas, como son la ausencia de modificaciones en las características del soporte, es fácilmente realizable desde el punto de vista del procesamiento, es universal para cubrir gran variedad de materiales y las biomoléculas depositadas están protegidas de la desnaturalización para evitar la pérdida de las funciones que ofrecen (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020). Las técnicas de realización del LbL se pueden combinar para lograr una mejor versatilidad, dando la capacidad de generar revestimientos con espesores determinados, concentraciones de biomoléculas determinadas y dar estabilidad al revestimiento (Keeney *et al.*, 2015). La única limitación es que ambas, soporte y capas depositadas de electrolitos, deben estar cargadas previamente a la realización del proceso. Para ello, se modifica el pH de las disoluciones de polielectrolitos para darles carga, y se usan métodos químicos como la aminólisis o la hidrólisis alcalina para dar carga a la superficie del soporte (Niemczyk-Soczynska *et al.*, 2020).

#### 1.4. FUNCIONALIZACIÓN POR LAYER-BY-LAYER

Como se ha dicho anteriormente, el método LbL ha ido ganando un interés considerable gracias a sus múltiples ventajas, como son su versatilidad y su facilidad de realización. Además, debido a la gran cantidad de materiales disponibles para la técnica y la capacidad de poder recubrir tanto sustratos planos como material particulado, se ha producido un crecimiento exponencial en la investigación sobre esta técnica (Campbell and Vikulina, 2020). También cabe destacar que

este método no requiere de equipamiento sofisticado ni de reacciones químicas complicadas para la deposición de las capas sucesivas (Silva *et al.*, 2016). Por todo ello, ha sido la técnica elegida para la realización de este trabajo.

#### **1.4.1. POLIELECTROLITOS**

Dependiendo de la naturaleza de los polielectrolitos, las multicapas pueden ser generadas a partir de materiales naturales, sintéticos o de una mezcla de ambos. Las obtenidas de materiales sintéticos tienen ventajas como la versatilidad en cuanto a su estructura química, los procesos de síntesis permiten introducir grupos cargados positiva o negativamente y también ajustar los pesos moleculares y la flexibilidad e la cadena a los requerimientos de la formación de las multicapas. Pese a todo ello, suelen ser no biodegradables, los productos de su degradación pueden ser dañinos y no presentan secuencias reconocibles por las células. En cambio, los naturales son frecuentemente biocompatibles, biodegradables, bioactivos, similares con los tejidos biológicos, es fácil dotarlos de la carga necesaria modificando el pH del medio. Sus desventajas principales son su disponibilidad limitada, dispersibilidad, bajas propiedades mecánicas o baja estabilidad en la solución final (Silva *et al.*, 2016).

Dado que los biomateriales representan el componente básico de los scaffolds usados en ingeniería tisular, el material ideal tiene que ser biocompatible, biodegradable y tener propiedades mecánicas favorables. Para lograr un soporte plano adecuado, en este trabajo se han seleccionado tres pares de polímeros naturales: gelatina (Gel) y alginato (Alg), quitosano (Chi) y condroitín sulfato (CS) y gelatina y condroitín sulfato.

El Chi, Alg y CS se encuentran dentro del grupo de los polisacáridos. Estos permiten a las multicapas imitar más fielmente a la matriz extracelular, a la vez que estimular respuestas celulares concretas (Silva *et al.*, 2016). El Alg es un biopolímero glicosídico producido industrialmente por algas marinas marrones, formado por ácido gulurónico y ácido manurónico. Es usado debido a su biocompatibilidad, biodegradabilidad, además de su bajo precio y abundancia (Zhang *et al.*, 2020). Se ha empleado en combinación con la gelatina con el fin de incrementar su resistencia, su capacidad de adhesión celular o su capacidad de diferenciación osteogénica (Yan *et al.*, 2017).

El Chi es un biopolímero de aminopolisacáridos extraído de crustáceos que se obtiene de la desacetilación parcial de la quitina en medio alcalino. Se emplea debido a que tiene la misma estructura que los GAG característicos de la ECM, permitiendo su biocompatibilidad, biodegradabilidad y su capacidad para promover la adhesión celular, proliferación y diferenciación osteogénica. En cambio, tiene unas propiedades mecánicas pobres lo que requiere su empleo con otros biopolímeros que aporten esta resistencia mecánica, como por ejemplo el CS (Zhang *et al.*, 2020).

El CS es un GAG que también abunda en la ECM. Es el responsable, en muchos casos, de la resistencia mecánica de tejidos gracias a la repulsión electrostática de sus grupos sulfato, lo que le hace especialmente atractivo para su uso en regeneración ósea. Además, desempeña un papel en procesos biológicos incluyendo la morfogénesis o la reparación de heridas (Criado *et al.*, 2016).

La Gel se obtiene por la hidrólisis parcial de colágenos de origen animal y presenta por tanto la secuencia de unión celular RGD (arginina, glicina y aspartato) propia de los colágenos. Es uno de los biopolímeros más versátiles y tiene la habilidad de promover la adhesión celular, proliferación y diferenciación. Se ha empleado como alternativa a los colágenos debido a sus numerosas ventajas, como es su alta solubilidad, siendo esta una limitación importante que

tienen los colágenos, su alta flexibilidad, es menos inmunogénico y retiene más sitios de unión celular que el colágeno (Zhang *et al.*, 2020). Además, es un componente crucial de la ECM de los tejidos conectivos. Una de sus principales desventajas es su baja fuerza mecánica, por lo que se requiere su uso con otros biopolímeros, como el Alg (Criado *et al.*, 2016).

Las propiedades de los recubrimientos LbL hechos de materiales naturales dependen de su estructura y de los parámetros de realización. Dependiendo del pH del medio, estos materiales actúan como polielectrolitos, además son dependientes de la constante de disociación ácida ( $pK_a$ ) de sus grupos reactivos. Para especies polianiónicas, como son el Alg y el CS en este trabajo, los grupos carboxílicos presentan una  $pK_a$  alrededor de 3-5, mientras que los grupos sulfato a 0,5-1,5. En las especies policatiónicas, como la Gel y el Chi, los grupos cargados son los grupos amina con una  $pK_a$  de 6,5-10. Así, los polielectrolitos se pueden agrupar en dos grupos: aquellos con cargas permanentes en disolución (fuertes), y aquellos cuya carga es dependiente del pH y de la fuerza iónica del medio débiles (Silva *et al.*, 2016).

#### **1.4.2. FACTORES INFLUYENTES EN EL RECUBRIMIENTO POR LBL**

Factores como el pH o la concentración salina pueden modificar la conformación, la ionización y la estructura del polielectrolito. Por ello, ligeros cambios en el pH de las disoluciones o en la concentración salina del medio puede causar cambios drásticos en la carga electrostática de los polielectrolitos, lo que es esencial para su interacción y para el crecimiento del recubrimiento. Añadir una concentración salina excesiva puede llegar a compensar todas las cargas presentes en el polielectrolito, mitigando las interacciones entre las proteínas y por ello no permitiendo el crecimiento de la multicapa. De modo que se puede controlar el grosor de la capa según la concentración salina de la disolución. De igual manera, el cambio de pH puede llegar a producir una alteración en la adsorción sucesiva de las capas. La adsorción y el grosor de la capa formada por un polielectrolito fuerte se puede ajustar controlando la concentración salina, mientras que para el polielectrolito débil se controla por variaciones en el pH dado que la densidad de carga de este es dependiente del pH (Alotaibi *et al.*, 2018). Se ha visto que bajos valores de pH tienden a incrementar el grosor de las capas, debido a la asociación con el incremento de grupos amonio ionizados en el polication débil (da Câmara *et al.*, 2019).

Además de estos dos factores mencionados, también adquieren importancia la concentración del polielectrolito y el tiempo dedicado a la inmersión. Se requiere el uso de disoluciones concentradas para lograr que haya suficiente carga en la capa depositada que invierta la carga opuesta de la capa anteriormente depositada. Esta concentración es variable entre polielectrolitos y va a depender de la solubilidad y la densidad de carga en el medio de la disolución de recubrimiento. En cuanto al tiempo dedicado a la deposición de la capa, se ha demostrado que alrededor de 15 minutos de inmersión para cada capa permite una óptima deposición (Alotaibi *et al.*, 2018).

El par Gel/Alg se ha empleado para varios aspectos, como para la creación de scaffolds de liberación de MSCs en sitios de regeneración de tejidos en el estudio realizado por Yang *et al.* (2009), además para la liberación controlada de fármacos como el antibiótico gentamicina mostrado por el estudio de Ratanavaraporn *et al.* (2018). En este último estudio se lograron espesores de capa de 8,2-9,4  $\mu m$  depositando dos bicapas de gelatina 0,1 % (w/v) y alginato 0,1% (w/v) durante tiempos de inmersión de 1 minuto.

El par CS/Gel ha sido utilizado en la síntesis del scaffold ideal para su uso en ingeniería tisular ósea estudiado por Yan *et al.* (2017), en este artículo se emplearon concentraciones de 1 % (w/v) de CS y 2% (w/v) de Gel con tiempos de inmersión de 30 minutos. También fue empleado por Criado *et al.*, 2016, con concentraciones de 1 % (w/v) para Gel y 1 % o 2,5 % (w/v) para CS, con

inmersiones de 15 minutos en cada polielectrolito y lavados de 3 minutos para obtener 5 bicapas de un hidrogel sensible a la temperatura.

El LbL del par CS/Chi se ha usado en preparaciones de 0,15 % (w/v) con inmersiones de 10 minutos en cada polielectrolito y lavados de 5 minutos para obtener 10 bicapas, en el caso de Silva et al. (2013). Su objetivo era la creación de un soporte 3D para la adhesión, proliferación y diferenciación condrogénica de MSCs. También se han usado para generar scaffolds de regeneración ósea (Park et al., 2013), o para emplearse en contacto con sangre debido a su potencial antimicrobiano y su eficiente endotelización (Imbir et al., 2020). En este último artículo se emplearon soluciones de 1 mg/mL de CS y 0,5 mg/mL de Chi para llegar a un film de 24 bicapas, logrando espesores de hasta 343 nm tras el entrecruzamiento.

Con el fin de aumentar la interacción entre capas y con ello su estabilidad, se realiza un entrecruzamiento usando agentes como la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) que se usa juntamente con *N*-hidroxisuccinimida (NHS), usados ambos en la realización de este trabajo. Este entrecruzamiento mejora, además de la estabilidad, la adhesión celular y la proliferación dado en que las capas más blandas se adhieren menos las células (Campbell and Vikulina, 2020). Este entrecruzamiento químico altera las interacciones entre los grupos funcionales de los polímeros, por ello se aplica para regular la estabilidad y las propiedades fisicoquímicas (Imbir et al., 2020).

En el estudio realizado por Pacelli et al. (2018) se analizaron diferentes densidades de entrecruzamiento con EDC/NHS en recubrimientos de gelatina y alginato para comparar sus propiedades mecánicas, liberación controlada de fármacos y proliferación celular. Se demostró que, al nivel medio de entrecruzamiento estudiado, el tiempo de gelificación, la capacidad de hinchamiento, la degradabilidad, la rigidez, la capacidad de liberación de proteínas y la adhesión, proliferación y diferenciación osteogénica de células madre adiposas eran los óptimos comparados con el nivel más elevado y bajo de entrecruzamiento (Pacelli et al., 2018).

Para el par quitosano/condroitín sulfato, el entrecruzamiento genera una disminución en la rugosidad de la superficie del film, disminuye la capacidad de absorción de agua, además de aumentar su rigidez (Imbir et al., 2020).

#### **1.4.3. DINÁMICA DEL RECUBRIMIENTO**

El crecimiento de la multicapa se puede producir por dos tipos de régimen: el crecimiento lineal y el crecimiento exponencial. El primero implica un recubrimiento que va creciendo linealmente con cada capa depositada, por lo tanto, el grosor incrementado en cada deposición permanece constante a lo largo del proceso. El segundo involucra una multicapa cuyo grosor va aumentando exponencialmente en cada paso de deposición, siendo el espesor de cada capa mayor que el de la anterior. El crecimiento lineal se produce solo con polielectrolitos fuertes, que generan capas muy ordenadas con grandes fuerzas de interacción entre ellas, ya que la carga del polielectrolito añadido sobrecompensa la carga ya depositada y permite la deposición de la capa siguiente. En cuanto al crecimiento exponencial, ocurrirá si al menos uno de los dos polielectrolitos usados es capaz de difundir a través de las capas, es decir, cuanto más débil sea la interacción entre ambos, más fácil es la difusión, causando el crecimiento exponencial (Campbell and Vikulina, 2020).

La temperatura de las disoluciones es un factor fácilmente ajustable para modular el grosor de las capas, simplemente subiendo o bajando la temperatura mientras se prepara el recubrimiento. Pese a que normalmente se realiza el LbL a temperatura ambiente, si se aumenta la temperatura en multicapas de crecimiento lineal se produce un aumento en la fluidez de las capas, llegando a alcanzar un régimen de crecimiento exponencial. Dado que este aumento de

temperatura genera una estructura más permeable que permite una difusión más rápida de las moléculas. Se ha de tener en cuenta que después de un número determinado de capas el crecimiento cambia de exponencial a lineal, debido a la difusión limitada dentro de las capas cuanto más grosor tenga la multicapa (Alotaibi *et al.*, 2018).

Por todo lo expuesto anteriormente, en este trabajo se va a realizar un estudio del efecto de la Gel y el CS sobre la adhesión y proliferación de células madre mesenquimales de médula ósea cultivadas sobre soportes que presenten dichas biomoléculas en su superficie. Para ello se busca la producción de soportes planos biomiméticos de PLLA que exhiban en la superficie CS o Gel, funcionalizados por LbL.



## 2. OBJETIVOS

Este Trabajo Fin de Grado se ha llevado a cabo en el ámbito de un proyecto más extenso que desarrolla un modelo de enfermedad del mieloma múltiple (MM). Se busca cocultivar células tumorales con células madre mesenquimales de médula ósea, bMSCs, y con osteoblastos, propios de su entorno. Debido a que los medios de cultivo inductores de la diferenciación osteogénica pueden ser incompatibles con el crecimiento de las células tumorales, este proyecto busca lograr que el cultivo de bMSC sobre ciertos soportes induzca su diferenciación espontánea hacia su linaje osteogénico. Ciertas proteínas y polisacáridos, como la gelatina y el condroitín sulfato, componentes de la matriz extracelular de la médula ósea, pueden tener un efecto en este sentido.

Por ello, como estudio preliminar, este trabajo se ha centrado en estudiar el efecto de la gelatina y el condroitín sulfato sobre la adhesión y proliferación de bMSCs. Se propone sintetizar soportes planos funcionalizados por layer-by-layer en el que se depositan alternativamente capas de moléculas cargadas positiva y negativamente, que se unen entre sí mediante interacciones electrostáticas.

Mediante esta propuesta, se busca cumplir los objetivos detallados a continuación:

1. Desarrollar el protocolo y la producción de soportes que exhiban en la superficie CS, o Gel, contruidos por LbL. En el caso de la gelatina, emplear el alginato como contra-ion; en caso del condroitín sulfato, emplear el quitosano; y emplear gelatina y condroitín sulfato como última combinación.
2. Automatizar el protocolo del recubrimiento de forma que se facilite en el futuro generar recubrimientos con números elevados de capas.
3. Determinar las características superficiales que permitan distinguir la presencia del recubrimiento y confirmar la presencia de sus componentes, además de caracterizar físicamente los distintos recubrimientos.
4. Estudiar el efecto de estas biomoléculas sobre la adhesión temprana de las bMSCs, caracterizando la morfología celular y las adhesiones focales.
5. Estudiar la proliferación de bMSCs cultivadas sobre los soportes en medio basal.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. SÍNTESIS DE SOPORTES FUNCIONALIZADOS POR LAYER-BY-LAYER

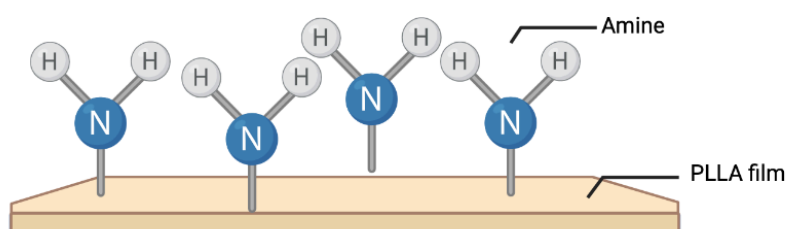
Se ha trabajado en la obtención de soportes de ácido poli-L-láctico (PLLA) funcionalizados por layer-by-layer (LbL) con recubrimientos de los pares Gelatina/Alginato (Gel/Alg), Condroitín sulfato/Quitosano (CS/Chi) y Condroitín sulfato/Gelatina (CS/Gel).

##### 3.1.1. OBTENCIÓN DE FILMS DE ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO

Se obtuvieron films de ácido poli-L-láctico, por el método de *solvent casting* o evaporación del disolvente, y se sometieron a un tratamiento de aminólisis para presentar grupos amina en su superficie. De esta manera, al sumergirlos en un medio ácido, los grupos amina se protonan formando grupos  $\text{NH}_3^+$ , y la superficie presenta la carga positiva sobre la que se depositará la capa del polianión determinado. Tras la capa del anión, se deposita el catión específico y se repite el proceso tantas capas como se requiera para el LbL.

Primero, se realizó una disolución al 5% w/v de ácido poli-L-láctico INGENIO 4042D (NatureWorks) en diclorometano estabilizado con aproximadamente 50 ppm de amileno CL0329 (Scharlab). Se dejó en agitador mecánico *overnight* a temperatura ambiente en recipiente cerrado para evitar la evaporación del disolvente. La disolución se vertió en una placa Petri de 30 mm de diámetro, y se llenó a media altura ( $\pm 5$  mm) para facilitar la separación del film una vez secado. Se colocó tapa de manera que quedase espacio para que el disolvente se evaporase y se dejó evaporar *overnight* el disolvente lentamente. Tras su obtención, se midió el grosor de las diferentes muestras con un micrómetro.

Tras la síntesis del film de PLLA, se realizó la aminólisis para protonar su superficie, como se representa en la figura 3, siguiendo el protocolo descrito por Ferreira *et al.* (2016). Se trató el film durante 30 minutos en una disolución de 1,6-hexanodiamina (Sigma-Aldrich) a 0,06 g/ml en 2-propanol (Scharlab) a T ambiente (25 °C). Tras esto, se lavó con abundante agua y se dejó a secar a vacío en un desecador *overnight*.



**Figura 3. Representación gráfica del resultado del proceso de aminólisis, obteniéndose un film de PLLA protonado por grupos amina. Ilustración creada con Biorender.com**

##### 3.1.2. RECUBRIMIENTO LAYER-BY-LAYER

Una vez realizada la aminólisis, se comenzó el LbL para cada par de polielectrolitos (Gel/Alg, CS/Chi y CS/Gel) con el objetivo de obtener films que en su superficie presenten gelatina o condroitín sulfato. La capa primera en ser depositada debía ser la del polianión (alginato o condroitín sulfato) para que interactuase con la capa de aminas protonadas ya presentes en el film.

Siguiendo el protocolo descrito por Ratanavaraporn *et al.* (2018), en el caso del par Gel/Alg, primero se realizaron dos disoluciones de gelatina (Gelatin from porcine skin, type A, Sigma-Aldrich) y alginato de sodio (Sigma-Aldrich) con un 1 mg/ml del polielectrolito correspondiente en una disolución de NaCl (Panreac) 0,01 M ajustado a pH 7.

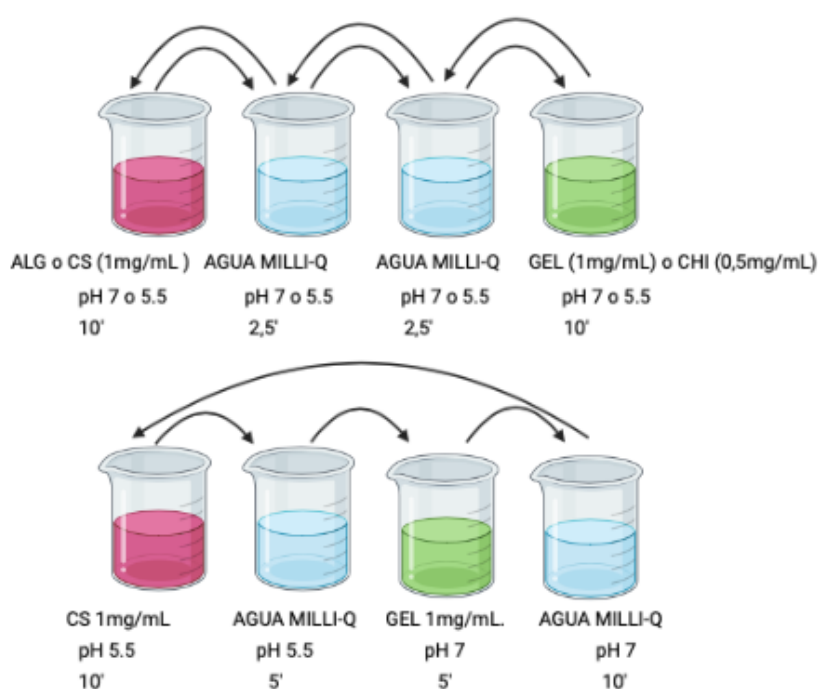
En el caso del par CS/Chi, se usaron condroitín sulfato de cartílago de tiburón (Sigma-Aldrich) y quitosano de conchas de cangrejo (Sigma-Aldrich), y se siguieron los pasos expuestos por Imbir *et al.* (2020). El condroitín sulfato a 1 mg/ml se disolvió en NaCl 0,15 M ajustado a pH 5,5. El quitosano, previamente a disolverlo en NaCl 0,15M ajustado a pH 5,5, tuvo que ser predisoluto en una disolución de ácido acético glacial al 1 % v/v (Scharlab). Teniendo una concentración final de 0,5 mg/ml.

Para el par CS/Gel se siguieron los mismos procedimientos correspondientes a cada uno de los polielectrolitos

Todas las disoluciones anteriores se dejaron en agitador mecánico *overnight* y luego se filtraron para eliminar impurezas con filtro de 0,45 µm de nylon.

El procedimiento para realizar el LbL se representa en la figura 4. Primero se sumergió el film en la solución del polianión determinado al pH adecuado durante 10 minutos. Para eliminar las cadenas de polímero no unidas del sustrato, después de cada proceso de deposición, los sustratos se lavaron en un agua Milli-Q ajustada al pH de la solución anterior dos veces durante un total de 5 minutos y por último se realizó una inmersión en la solución del policación al pH determinado durante 10 minutos. El proceso se repitió hasta conseguir 10 bicapas con los polielectrolitos Gel o CS exhibiéndose en la superficie.

Con el fin de llevar a cabo este procedimiento, se programó la impresora 3D Original Prusa i3 MK3S+ para llevar a cabo los movimientos de inmersión del film en cada disolución de manera autónoma.



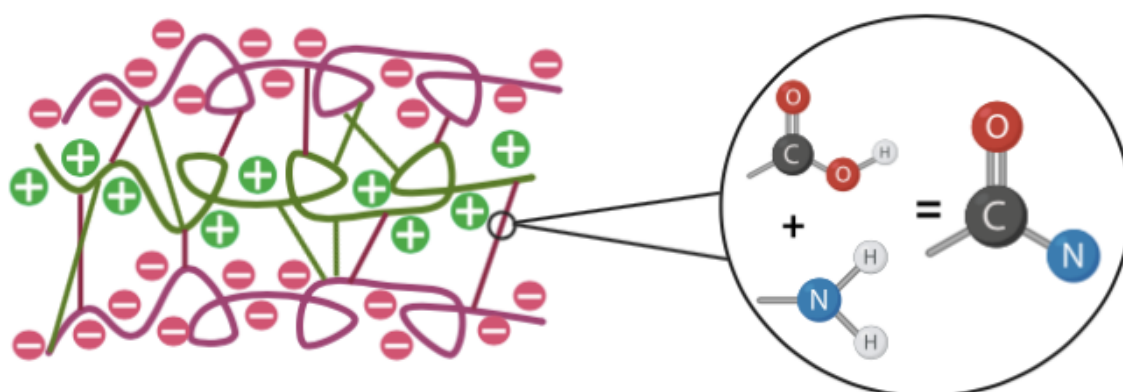
**Figura 4. Representación esquemática del proceso de inmersión de los films de PLLA para la obtención de los recubrimientos LbL. Ilustración creada con Biorender.com**

### 3.1.3. ENTRECRUZAMIENTO

Tras el LbL, se realizó un procedimiento de entrecruzamiento de las capas para compactar el recubrimiento y aumentar la estabilidad del soporte, siguiendo el protocolo expuesto por Imbir *et al.* (2020). Para el entrecruzamiento se utilizaron N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) 98% y 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich). Estas moléculas son un intermediario de la reacción de entrecruzamiento, facilitando la reacción entre un grupo amina del polication (Gel o Chi) y un grupo carboxílico del polianión (CS o Alg), generando un enlace amida, como se puede ver en la figura 5.

Los agentes químicos se prepararon en una solución de NaCl 0,15 M ajustada a pH 5,5 y luego se mezclaron en una relación de volumen de 1:1 directamente antes de la incubación. En los experimentos se utilizaron concentraciones finales de EDC 260 mM y NHS 100 mM. La incubación del film en la mezcla se realizó overnight a 4°C.

Posteriormente, se eliminó el NHS/EDC mediante una combinación de ácido 4-(3-hidroxietil) piperazina-1- etanosulfónico (HEPES) 10 mM (Scharlab) y solución de NaCl 0,15 M (ajustando la mezcla a pH 7,4). Se llevó a cabo un procedimiento de lavado en dos etapas, en el que las películas, en primer lugar, se aclararon dos veces durante una hora con agitación lenta. La segunda etapa incluyó el lavado tres veces durante 10 minutos. Una vez acabado el lavado, los films se volvieron a lavar con agua Milli-Q con el objetivo de eliminar cualquier sal restante en su superficie. Para almacenar los films se dejaron en desecador.



**Figura 5. Representación gráfica del proceso de entrecruzamiento entre las cadenas de polielectrolitos del recubrimiento, creándose un enlace amida por la reacción entre un grupo carboxílico y un grupo amina. Ilustración creada con Biorender.com**

## 3.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE SOPORTES FUNCIONALIZADOS POR LAYER-BY-LAYER

### 3.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)

Se empleó el microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM) de la marca Zeiss, modelo Ultra 55, facilitado por el Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV. Este microscopio permite un estudio de la superficie de los soportes gracias al barrido de un haz de electrones sobre la muestra y su captación por un detector.

Los films se recubrieron con platino, mediante un protocolo estándar de 90 segundos. Se empleó un potencial de aceleración de 1kV para evitar los daños posibles causados por el haz de electrones en la superficie de la muestra.

De este modo, se obtuvieron fotografías de la superficie de cada soporte recubierto de Gel/Alg, CS/Chi o CS/Gel y de la muestra sin recubrir de PLLA, que nos permitieron demostrar la presencia del recubrimiento y sus topografías características.

### **3.2.2. ÁNGULO DE CONTACTO**

Se empleó la medida del ángulo de contacto consistente en el cálculo del ángulo que forma una gota de líquido cuando entra en contacto con la superficie de un material, mediante el uso del equipo de medida de ángulo de contacto OCA 20 (Dataphysics). De esta manera, dependiendo de la fuerza de adhesión que ejerza la superficie, la gota se verá más o menos atraída y el ángulo resultante será mayor o menor a 90°. Así, se midieron los recubrimientos de Gel/Alg, CS/Gel, CS/Chi junto con PLLA sin recubrir para estudiar la mojabilidad de cada material usando gotas de 3 µL de agua Milli-Q.

### **3.2.3. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)**

Se empleó la espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) para obtener un espectro de transmitancia de luz infrarroja característico para cada material que permite diferenciar la presencia de los grupos funcionales propios de este. Así, se pretendió diferenciar los espectros de las muestras de PLLA sin recubrir de aquellas con recubrimientos de Gel/Alg, CS/Chi o CS/Gel.

Las medidas se tomaron en un espectrómetro ALPHA-FTIR (Bruker) en modo de reflectancia total atenuada, ATR, desde 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, con una resolución de número de onda de 4 cm<sup>-1</sup>. Se empleó el software OPUS (FTIR Software, Bruker) para obtener los espectros de transmitancia que luego graficados por el software OriginPro 8.0 (Northampton, United States). De esta manera, se obtuvieron gráficas compiladas para cada muestra recubierta comparada con la muestra sin recubrir de PLLA.

### **3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE CONDROITÍN SULFATO**

Para determinar la concentración de CS presente en los soportes de CS/Chi y CS/Gel con 10 bicapas se empleó el kit B1000 Blyscan (Biocolor). Se trata de un ensayo cuantitativo de colorimetría que analiza GAGs sulfatados como el CS. Brevemente, el colorante a usar es el 1,9-dimetilmetileno azul que se une específicamente a las cadenas de GAGs, generando un compuesto insoluble que después es recuperado y solubilizado mediante un reactivo de disociación. Esta solubilización genera un cambio de color dependiente de la concentración del GAG y cuantificable mediante un espectrofotómetro. Mediante el empleo de una curva con concentraciones conocidas del glicosaminoglicano en cuestión se obtiene la concentración total de GAGs presente en la muestra de interés.

Se troquelaron los soportes en discos de 8 mm de diámetro (3 réplicas por condición CS/Chi, CS/Gel y PLLA sin recubrir como control negativo). Tras esto, se preparó una curva de calibrado empleando una solución de condroitín sulfato, siendo los puntos de dicha curva 0, 1, 2, 3, 4 y 5 µg. Se añadió 1 mL de blyscan dye reagent a cada muestra y se incubó durante 30 minutos en agitación.

Después, se centrifugó el dye reagent a 13000 rpm durante 10 minutos para obtener un precipitado morado. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 0,5 mL del dissociation reagent. Se agitó durante 10 minutos para favorecer la liberación del Cs unido al 1,9-dimetilmetileno azul.

Por último, se pipetearon 100  $\mu\text{L}$  por muestra en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 660 nm empleando el espectrofotómetro de placas VICTOR multilabel plate reader (Perkin-Elmer) y se obtuvieron los datos de absorbancia gracias al software Wallac.

### **3.2.5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GELATINA**

Del mismo modo, para establecer la concentración de gelatina que se hallaba en los soportes con recubrimientos Gel/Alg y CS/Gel se usó el kit BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Este ensayo de colorimetría permite cuantificar la cantidad de gelatina en dichas muestras gracias a la reacción de reducción del  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  generada por las proteínas en medio alcalino y a la detección colorimétrica del complejo de color morado intenso formado por la unión de este último ión  $\text{Cu}^{1+}$  con el ácido bicinónico (BCA). Mediante el empleo de una curva con concentraciones conocidas de gelatina se obtiene la concentración total de la misma presente en la muestra de interés.

Mediante el empleo de 3 discos de 8mm de diámetro por cada condición (PLLA, Gel/Alg y CS/Gel) se realizó este ensayo siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las muestras con el reactivo de trabajo durante 2 horas a 37°C. Pasadas estas 2 horas, se pipetearon 100  $\mu\text{L}$  por muestra en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 562 nm empleando el espectrofotómetro de placas VICTOR multilabel plate reader (Perkin-Elmer) y se obtuvieron los datos de absorbancia gracias al software Wallac.

### **3.2.6. MICROSCOPIA DE FUERZA ATÓMICA (AFM)**

Se utilizó la microscopía de fuerza atómica, AFM, con el fin de obtener información sobre el grosor de cada tipo de recubrimiento. El ensayo se basa en practicar un corte en el recubrimiento que llegue hasta el sustrato, pero no penetre en él. El barrido en el AFM midiendo la topografía de la superficie permite una medida muy precisa del espesor. Para ello fue necesario realizar los recubrimientos LbL sobre soportes de vidrio en los que no penetra la cuchilla con la que se corta el recubrimiento.

Se empleó el modelo Bruker Multimode 8 operando en modo tapping, junto con una punta de silicio modelo Bruker RFESPA con una frecuencia resonante de 75 kHz, un resorte constante de 3 N/m y una velocidad lineal fijada en 2  $\mu\text{m/s}$ . La longitud libre de oscilación de 700 mV se aplicó modificando la amplitud de impulso. Se mantuvo una ratio entre el punto de ajuste de amplitud y la amplitud libre de 0,85. Para el análisis de las imágenes tomadas por AFM, el software NanoScope Analysis v1.50 (Bruker, Madrid, España) fue empleado. Las medidas fueron realizadas por José Carlos Rodríguez Hernández, Profesor Ayudante Doctor del departamento de Termodinámica Aplicada de la UPV, en el servicio de microscopia de la UPV.

Para la realización del AFM se prepararon los recubrimientos de LbL sobre vidrio. Se siguió el protocolo explicado por Zhou *et al.* (2015). Brevemente, se limpiaron los cubreobjetos de vidrio ( $\varnothing$  12mm) con 0,5 M NaOH (Scharlab) en 96 % etanol (Scharlab) durante 2 horas seguido de un enjuagado extensivo con agua destilada. Se secaron los cubreobjetos mediante secado con etanol absoluto.

Se utilizó polietilenimina (PEI) adsorbida sobre el vidrio como capa con carga positiva que permitiese el anclaje de las sucesivas capas del LbL. La PEI (750 kDa, Sigma-Aldrich) se disolvió en 0,15M NaCl ajustado a pH 7,4 en una concentración de 5 mg/mL. Los soportes de vidrio se sumergieron en esta disolución durante 15 minutos y tras esto se lavaron los vidrios con una disolución de 0,15M NaCl ajustada a pH 7,4 tres veces durante 5 minutos. Posteriormente, se

siguieron los pasos del LbL, comenzando con el polianión, hasta llegar a 10 bicapas en cada combinación de polielectrolitos.

### 3.3. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

Se realizaron cultivos *in vitro* con células madre mesenquimales humanas de médula ósea (bMSC, Promocell, Germany) para estudiar la respuesta biológica de los distintos pares de LbL en términos de adhesión y proliferación. Se estudió la adhesión celular sobre los diferentes soportes a 3 horas, así como el efecto sobre la proliferación de las bMSC a 1, 3 y 7 días.

#### 3.3.1. EXPANSIÓN CELULAR

Las células madre mesenquimales presentes en un criovial se descongelaron pipeteando 1 mL de su contenido en 9 mL de Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 (Promocell) suplementado con Supplement for Mesenchymal Stem Cell Growth Medium 2 al 10 % v/v y Penicilina/estreptomicina (P/S) al 1 % v/v, atemperado a 37°C. Se centrifugó a 250 g (1200 rpm) durante 5 minutos, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL de medio Promocell. Se realizó un recuento de densidad celular mediante la cámara Neubauer de acuerdo con la siguiente ecuación (Ecuación 1):

$$\frac{\text{Células}}{\text{mL}} = \frac{N^{\circ} \text{ de células vivas totales}}{8 \text{ (cuadrantes)}} \times 10^4 (\text{factor de dilución Neubauer})$$

**[Ecuación 1]**

Se añadieron 8 mL de medio Promocell a la suspensión celular de 2 mL y se sembró la suspensión celular a una densidad de 4000 cells/cm<sup>2</sup> en flascos T75 tratados para su expansión.

Tras esto, se realizó un cambio de medio a las 24h por medio de expansión, el que se empleó más tarde para el cultivo de las células sobre los films recubiertos. Siendo el medio de expansión medio DMEM high glucose (4.5 g/L) w/o L-Glutamine w/o Pyruvate (Biowest L-0101) suplementado con 10 % v/v de Suero Fetal Bovino (FBS), 1 % v/v de Non-Esential AminoAcids (NEAA 100X), 1 % v/v de Sodium Pyruvate (100 mM) y 2 % v/v de Antibiotic Mix (L-glutamina (200 mM), P/S (10.000 U/mL), Fungizona (250 ug/mL) en proporciones 150:100:12,5).

Se realizó otro cambio de medio a las siguientes 24h por medio de starving (medio de expansión con tan solo un 1% v/v de FBS) y se dejó *overnight* (12-14h), para sincronizar el ciclo celular.

El último cambio de medio se realizó tras estas 12-14h, por medio de expansión de nuevo, para lograr la reactivación del metabolismo celular y se mantuvo 3h antes de tripsinizar las células para su siembra.

#### 3.3.2. ESTERILIZACIÓN DE LOS FILMS

Primeramente, se realizó la esterilización de los materiales. Para ello, se sometieron los films de PLLA previamente troquelados (8 mm Ø) y marcados a una esterilización con rayos UV durante 30 minutos para cada cara. Se realizaron 3 lavados de los films con el buffer salino DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline) estéril durante 5 minutos en agitación.

#### 3.3.3. COATING DE FIBRONECTINA SOBRE LOS FILMS

La fibronectina (FN) es una glucoproteína abundante en la matriz extracelular que se une tanto a proteínas de la membrana plasmática, como son las integrinas, además de unirse a varias

moléculas de la matriz extracelular, como la gelatina o algunos glicosaminoglicanos. Por tanto, ejercen de unión entre las moléculas de la matriz con las moléculas de la membrana celular. De modo que realizamos un coating de FN sobre cada film, previo a la siembra de las células sin emplear suero, para asegurar que la única adhesión que realiza la célula es con esta proteína o con los ligandos presentes en la gelatina del propio sustrato y no con otras proteínas del medio de cultivo.

Previo a la siembra, se realizó un coating de FN sobre una cara de los films, con una disolución de FN a 20 µg/mL (Fibronectin from human plasma, Sigma-Aldrich). Se añadieron 70 µL sobre la superficie de cada film y se incubó 1h a temperatura ambiente. Tras esto, se realizaron dos lavados con DPBS para eliminar la fibronectina no adsorbida sobre la superficie y se colocaron los films en los pocillos de una placa p48.

#### **3.3.4. SIEMBRA SOBRE LOS FILMS**

Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia se tripsinizaron para sembrarlas sobre los biomateriales. Para tripsinizar, se retiró el medio de cultivo del flascón y se lavó con 8 mL de DPBS previamente atemperado a 37°C. Tras esto, se añadieron 3 mL de tripsina/EDTA previamente atemperada a 37°C y se dejó incubar 5 minutos a 37° C. Luego, se añadieron 6 mL de medio de expansión con FBS para bloquear la tripsina, se recuperó la suspensión celular y se centrifugó 5 minutos a 250g (1200 rpm). Se resuspendió el pellet en 5 mL de medio de expansión sin FBS y se realizó un recuento empleando la cámara Neubauer.

Tras el recuento, se obtuvo una suspensión celular con el número de células necesario para los ensayos posteriores de adhesión y de proliferación, en los que se emplearon densidades celulares de siembra sobre los diferentes soportes de 10.000 células/cm<sup>2</sup>. Se depositaron 100 µL de estas suspensiones celulares, en medio sin FBS, sobre la superficie de los films colocados en la placa p48. Pasadas 3 horas una vez producida la adhesión de las células sobre los soportes, se añadió medio con FBS al 10 % v/v hasta completar los 300 µL.

#### **3.3.5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN**

El ensayo de proliferación MTS es un ensayo de colorimetría que permite la cuantificación de células viables, basándose en la reducción del reactivo MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium), generando un compuesto coloreado, llamado formazan, soluble en el medio de cultivo. Solamente las células metabólicamente activas pueden realizar esta reacción gracias a su enzima deshidrogenasa dependiente de NAD(P)H. La absorbancia de este compuesto coloreado se mide con un espectrofotómetro a 490 nm, resultando ésta proporcional a la cantidad de células viables.

Para la realización de este ensayo se empleó el MTS Cell Proliferation Assay Kit (Biovision). Se emplea medio de cultivo sin rojo fenol para evitar que el color del medio afecte a la lectura de la absorbancia.

La proliferación se estudió a 1, 3 y 7 días, empleándose los siguientes tipos de recubrimientos: PLLA sin recubrimiento, PLLA recubierto de CS/Chi, PLLA recubierto de Gel/Alg y PLLA recubierto de CS/Gel y cubres de vidrio como control adicional. Se usaron 4 réplicas biológicas por material y por tiempo, junto con 1 réplica por material y por tiempo sin células como control de la absorbancia del material del film.

Una vez finalizado el tiempo de cultivo indicado para cada muestra, se retiró el medio de los cultivos y se realizaron dos lavados con 500 µL/pocillo de DPBS a las células sembradas sobre los



materiales para eliminar restos de medio. Tras esto, se añadieron 250  $\mu$ L/pocillo de reactivo MTS (medio DMEM sin rojo fenol 10 g/L (Dulbecco's Modified Eagles Medium-low glucose powder, Sigma-Aldrich) + 1:10 reactivo MTS), dejando en incubación 2 h a 37°C. Después de la incubación, se leyó la absorbancia en una placa p96, depositando 70  $\mu$ L por muestra. Para ello se realizaron tres lecturas (réplicas técnicas) por réplica biológica y se leyó la absorbancia a 490 nm 0.1 s con un lector de placas VICTOR 3 multilabel plate reader (Perkin Elmer) y se obtuvieron los datos de absorbancia gracias al software Wallac.

Con el fin de poder obtener el número total de células viables, se sembraron distintos pocillos que contenían un número de células conocido, generando así una curva de calibrado que permitió comparar la absorbancia obtenida para cada muestra con la recta de calibrado, obteniéndose el número total de células vivas para los días estudiados.

### **3.3.6. INMUNOFLORESCENCIA DE COMPONENTES CELULARES**

Con el objetivo de visualizar tres componentes (núcleo celular, citoesqueleto de actina y adhesiones focales con vinculina) de las células cultivadas sobre los diferentes tipos de films, se emplearon los marcadores fluorescentes DAPI, faloidina y el anticuerpo monoclonal anti-vinculina, respectivamente. Con el fin de poder observar cómo se adaptan las células morfológicamente al entorno impuesto y así estudiar su adhesión al sustrato. El DAPI (4',6-diamino-2- fenilindol) es un marcador fluorescente que se une a los núcleos de las células y así emite fluorescencia en la zona azul del espectro visible, debido a su habilidad para atravesar las membranas celulares y tras esto adherirse a las regiones con alta cantidad de adenina y timina en las cadenas de DNA. La faloidina es un péptido que se marca con el fluorocromo tetrametilrodamina logrando una sonda de actina filamentosa que marca a estas estructuras con un color rojo. El anticuerpo monoclonal anti-vinculina procedente de ratón se une específicamente a la vinculina de las adhesiones célula-sustrato y célula-célula. Mediante un marcaje inmunofluorescente indirecto usando el anticuerpo secundario marcado con fluorocromo Alexa Fluor 488 goat anti-mouse, se logran visualizar las adhesiones focales de las células con un color verdoso.

Para este ensayo de adhesión a 3 horas se emplearon 5 tipos de films: PLLA sin recubrimiento, PLLA recubierto de CS/Chi, PLLA recubierto de Gel/Alg y PLLA recubierto de CS/Gel y cubreobjetos de vidrio como control adicional. Se emplearon tres réplicas por cada tipo de soporte.

Pasadas las 3h se fijaron las células del cultivo de adhesión. Para ello, se eliminó el medio de cultivo y se realizaron 3 lavados con 500  $\mu$ L/pocillo de DPBS no estéril a temperatura ambiente a 37°C. Se eliminó el DPBS del último lavado y se añadieron 500  $\mu$ L/pocillo de paraformaldehído (Panreac) al 4 % v/v. Tras esto, se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y después se realizaron 3 lavados con DPBS no estéril. Por último, se retiró el DPBS del último lavado y se añadió 500  $\mu$ L de azida sódica al 0.05 % en DPBS. Una vez alcanzado este punto, se conservaron las muestras a 4°C hasta realizar la inmunofluorescencia.

Para realizar la inmunofluorescencia, primero se realizaron 3 lavados de 5 minutos con DPBS para eliminar los restos de azida sódica. A continuación, se realizó la permeabilización con el fin de permitir la entrada de los marcadores dentro de las células, para ello se añadieron 100  $\mu$ L de permeabilization buffer, que contiene 0.1 % de Triton X-100 (Sigma-Aldrich) en DPBS, y se incubó durante 10 minutos. Tras esto, se eliminó el buffer de permeabilización con ayuda de papel junto con 3 lavados de 5 minutos con DPBS y se realizó el bloqueo añadiendo 100  $\mu$ L de blocking buffer DPBST (DPBS + 0.1 % de Tween-20 (Sigma-Aldrich)) con 1 % w/v de Albumina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich)) durante 1 hora, con el objetivo de bloquear posibles sitios de unión

inespecífica del anticuerpo. Se eliminó el buffer de bloqueo con ayuda de papel y se incubaron las muestras *overnight* en cámara húmeda a 4°C con 100 µL del anticuerpo primario (Mouse Monoclonal antibody to vinculin, Sigma-Aldrich V-9131) diluido 1:300 en PBST + 1 % BSA. Después de esta incubación, se eliminó el anticuerpo primario y se lavaron las muestras 3 veces con 0.1 % Tween-20 en DPBS durante 5 minutos. Posteriormente, se incubaron las muestras con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 goat anti-mouse (Thermo Fisher Scientific) (Dilución 1:700) en DPBST + 1 % BSA y se añadió también Actin Red 555 Ready Probes Reagent (Thermo Fisher Scientific), siguiendo instrucciones del fabricante, para visualizar el citoesqueleto de actina, añadiendo los dos a la vez en tampón de bloqueo. De estos, se añadieron 100 µL por muestra y se incubó durante 1 h en cámara húmeda a temperatura ambiente. Por último, se lavaron las muestras 5 veces con DPBS + 0.1 % Tween-20 durante 5 minutos en oscuridad y se añadieron 30 µL de medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector Laboratories), incubando 20 minutos antes de observar en el microscopio de fluorescencia.

Se tomaron fotos con el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse 80i a 60 X con aceite de inmersión. Alrededor de 30 células por condición fueron analizadas mediante el software de análisis de imagen CellProfiler 4.1.3 (Broad Institute), realizando una cuantificación tanto de las áreas como de las circularidades de las células, empleando la fórmula de la circularidad que se muestra a continuación (Ecuación 2) y obteniendo valores entre 0 y 1, siendo 1 una circularidad perfecta.

$$Circularidad = \frac{4\pi Area}{Perimetro^2} \text{ [Ecuación 2]}$$

### 3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los resultados se expresan como promedio  $\pm$  desviación estándar. El análisis estadístico se ha realizado con el software GraphPad Prism 9 (Graphpad software, California, United States). Para el estudio estadístico de todos los datos obtenidos en este trabajo, se ha realizado el test de normalidad Shapiro-Wilk. Si la hipótesis de normalidad es aceptada para el conjunto de datos analizado se ha realizado un test paramétrico, en caso contrario se ha llevado a cabo uno no paramétrico. En los casos donde se comparan 3 o más grupos, se ha realizado un estudio de la varianza one-way ANOVA, para las tests paramétricos; o Kruskal-Wallis, para los no paramétricos. Comparando 2 grupos se realizó un t-test como análisis paramétrico, o un test de Wilcoxon Mann-Whitney como no paramétrico. Se estableció un intervalo de confianza del 95% para aceptar diferencias significativas entre grupos ( $p$ -value <0.05). Los diferentes valores de  $p$ -value obtenidos se han representado en las gráficas realizadas mediante los símbolos *ns*, \*, \*\*, \*\*\* y \*\*\*\*; correspondientes a los valores 0.1234, 0.0332, 0.0021, 0.0002 y <0.00001 respectivamente.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. FABRICACIÓN DE LOS SOPORTES FUNCIONALIZADOS

Este proyecto se ha centrado fundamentalmente en la fabricación de soportes de ácido poli-L-láctico funcionalizados por layer-by-layer con recubrimientos de los pares Gelatina/Alginato, Condroitín sulfato/Quitósano y Condroitín sulfato/Gelatina, de manera que presentasen gelatina (en los pares Gel/Alg y CS/Gel) o condroitín sulfato (en el par CS/Chi) en su superficie y así estudiar el efecto de dichas biomoléculas sobre la adhesión y proliferación de células madre mesenquimales de médula ósea. Además, hemos llevado a cabo una caracterización, tanto física como biológica, para así obtener soportes biomiméticos que permitan la expansión de bMSCs sobre estos.

Primeramente, se obtuvieron los films de PLLA como soportes para llevar a cabo el procedimiento de LbL posteriormente. En la Tabla 1 se recogen las diferentes medidas del grosor inicial de dichos films. El PLLA se ha usado como soporte por razón instrumental, por ser un polímero biocompatible, biodegradable y de fácil manejo, ampliamente utilizado en Ingeniería Tisular como soporte de cultivo. La importancia del estudio recae en los diferentes tipos de recubrimientos depositados por LbL, no del material empleado como soporte.

Estos films fueron aminolisados posteriormente con el fin de lograr que su superficie presentase carga positiva que permitiese la deposición de la primera capa del polianión en el proceso de LbL, creándose las interacciones electroestáticas necesarias para ello.

**Tabla 1. Medidas del grosor de los soportes de PLLA previo a su funcionalización. Medidas en  $\mu\text{m}$ .**

Muestra	1	2	3
Grosor ( $\mu\text{m}$ )	275	107	158

Tras esto, se continuó con la funcionalización de estos films mediante el método LbL detallado en el apartado 3.1.2 y con el entrecruzamiento del recubrimiento resultante, explicado en el apartado 3.1.3. Primeramente, fueron empleadas las biomoléculas gelatina y condroitín sulfato junto con sus contra-iones, alginato y quitósano respectivamente, debido a varias razones. Por una parte, debido a la intención de estudiar el efecto de Gel y CS sobre la adhesión y proliferación de bMSCs, era necesario generar recubrimientos completos, es decir, tener sistemas en los que Gel y CS se alternasen con otro componente de carga opuesta del que no se esperase una respuesta celular, por eso se prepararon recubrimientos Gel/Alg, con gelatina como policación y alginato como polianión a pH 7, y con su última capa de Gel; y del par CS/Chi, con condroitín sulfato como polianión y quitósano como policación a pH 5,5, y con su última capa de CS.

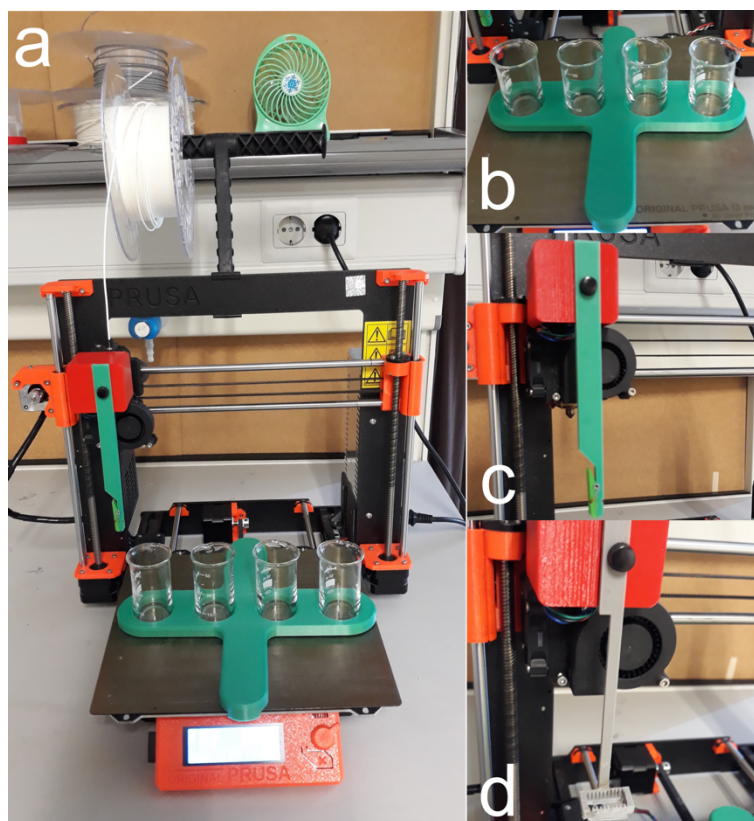
Por otro lado, se seleccionaron estos pares debido a que se buscaba un crecimiento exponencial del recubrimiento que permitiese un grosor mucho mayor del que se pudiese obtener de un crecimiento lineal, y por ello, como ya se ha explicado previamente, era necesario contar con polielectrolitos con interacción débil que permitiese su difusión a través de capas causando este crecimiento exponencial (Campbell and Vikulina, 2020). De esta manera, con un grosor de recubrimiento mayor se permite la realización de un mayor número de ensayos de caracterización físicos y cabría la posibilidad de generar, en un futuro, un recubrimiento auto sostenido que pueda separarse del soporte de PLLA con un número elevado de bicapas depositadas.

Con el entrecruzamiento químico posterior entre los componentes del recubrimiento, se buscaba aumentar la estabilidad del recubrimiento compactándolo, y favoreciendo además la posterior adhesión celular dado que mantiene más fuertemente adherida a la fibronectina al recubrimiento.

Inicialmente se realizaron films de 5 bicapas con los pares Gel/Alg y CS/Chi, posteriormente se aumentó el número de bicapas a 10 y se añadió un nuevo par Gel/CS, con la intención de estudiar el efecto de un recubrimiento con dicha combinación no planteada anteriormente. Para realizar el protocolo de LbL con los diferentes números de bicapas y de una manera autónoma y escalable a mayor número de bicapas, se programó la impresora 3D Prusa i3 MK3S+. Como puede observarse en la figura 6, se dispuso de este tipo de impresora 3D para colocar los distintos vasos de precipitados con las disoluciones de polielectrolitos donde se sumergiría el film de PLLA sujetado por una pinza (figura 6, a). De esta manera, se diseñó un soporte donde ubicar los vasos de precipitados de una manera controlada y así evitar posibles oscilaciones de estos vasos (figura 6, b). Además, se emplearon dos tipos distintos de pinzas que sujetarían el film de PLLA (figura 6, c) así como los vidrios nombrados en el apartado 3.2.5 (figura 6, d) y que realizaría los movimientos de inmersión en los sucesivos vasos de precipitados. Todas las piezas fueron fabricadas por la propia impresora 3D, con la ayuda de Ricardo Pérez, técnico de laboratorio del departamento de Termodinámica Aplicada de la UPV y de Joaquín Ródenas, técnico de nuestro grupo de investigación en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT)

Con el fin de programar los movimientos que la impresora 3D debía ejecutar para el LbL, se diseñó un código, observable en el anexo 7.1, que consistió en un programa de texto GCODE que dirige los movimientos que realiza el cabezal de la impresora y por ello, con el accesorio diseñado, el movimiento del propio film de PLLA. En este código, se definieron los valores de diferentes las coordenadas de los ejes X e Y para lograr que la impresora 3D desplazase la pinza de derecha a izquierda y por ello, el film se situase en la posición de cada vaso de precipitados o agitase este una vez situado dentro de la disolución. Además, se definieron las coordenadas del eje Z, de modo que la pinza descendiese y el film se sumergiera dentro de la disolución, o así mismo, ascendiese y el film saliese del vaso de precipitados. Todo ello fue codificado mediante las ordenes G0, de ejecución de la orden en una posición, y G4, de *stop* durante un tiempo determinado.

Gracias al diseño de este código, se permite programar dicha impresora 3D para que realice el LbL de manera autónoma y escalable al número de bicapas que se desee depositar, dado que en el anexo 7.1 se muestra el código para 1 bicapa, pero en este trabajo se han realizado protocolos de 5 y 10 bicapas ampliando dicho código.



**Figura 6. Imágenes de la impresora 3D Prusa i3 MK3S+ junto con sus complementos fabricados.**

## **4.2. CARACTERIZACIÓN FÍSICA**

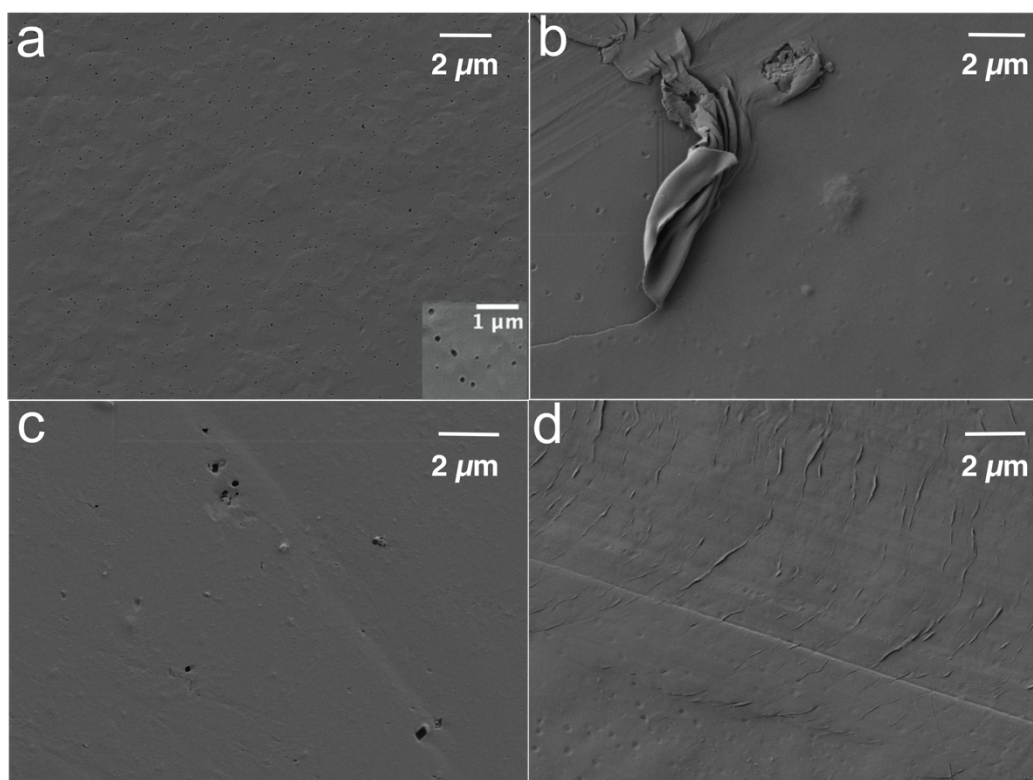
Tras la síntesis de los distintos soportes planos funcionalizados, se caracterizaron físicamente para comprobar la presencia de estos recubrimientos y sus características.

### **4.2.1. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (FESEM)**

La visualización de las diferentes muestras a mediante microscopía electrónica se realizó con el fin de poder demostrar la presencia del recubrimiento por LbL y poder observar además la topografía de cada tipo de superficie. Se compararon las muestras de PLLA sin recubrir con las muestras cubiertas con los diferentes materiales de manera superficial.

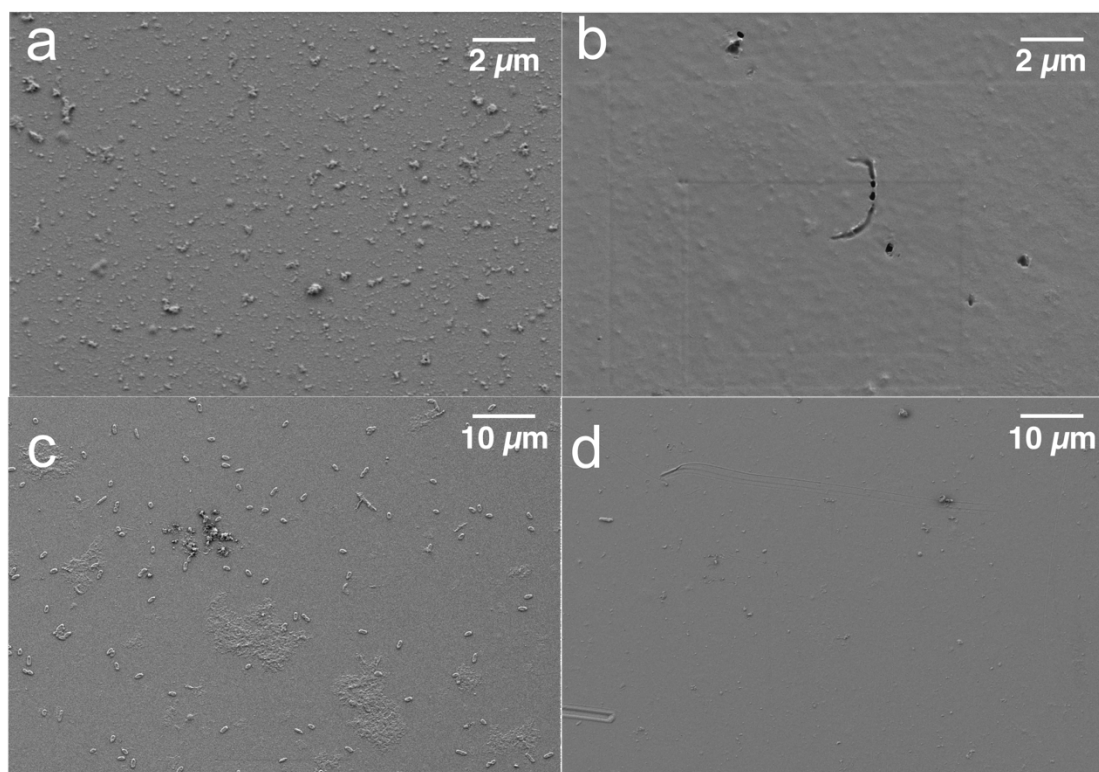
Inicialmente se obtuvieron imágenes de las distintas muestras con 5 bicapas, solo de los recubrimientos iniciales Gel/Alg y CS/Chi, que pueden visualizarse en el anexo 7.2. Posteriormente se tomaron más imágenes de muestras con 10 bicapas con los tres pares de recubrimientos finales, Gel/Alg, CS/Chi y CS/Gel, mostradas en la figura 7. Como se observa en dicha figura, existen diferencias visibles comparando la muestra de PLLA sin recubrir (figura 7, a), con las muestras recubiertas con CS/Chi (figura 7, c), Gel/Alg (figura 7, b) y CS/Gel (figura 7, d). Primeramente, el PLLA contiene poros de tamaño nanométrico producto de la evaporación del disolvente, cosa que no se observa en el resto de las muestras, demostrando la presencia de un recubrimiento que cubre esos poros. Otro aspecto por destacar es la presencia de esferulitas en la muestra de PLLA sin recubrir. Estas son estructuras con forma de esfera características de los polímeros semicristalinos como el PLLA, siendo un agrupamiento de cristales en forma de láminas que parten del núcleo de cristalización y que tienen crecimiento radial (Furukawa *et al.*, 2005).

En las muestras recubiertas con CS/Chi, Gel/Alg y CS/Gel ya no se observa ese relieve que generan las esferulitas, y en cambio se ve una superficie plana que demuestra que el recubrimiento ha sido efectivo y que ha tapado las esferulitas. También cabe mencionar que en la muestra Gel/Alg se pudo apreciar una zona en el recubrimiento en el que las capas se habían despegado del soporte de PLLA, dejando visible una zona con poros propia del PLLA y otra zona cubierta por el recubrimiento donde no se visualizan estos. En el caso del recubrimiento Gel/CS, se observa una superficie más rugosa causa del propio recubrimiento, al contrario que en el recubrimiento CS/Chi, que muestra una región con una topografía más lisa.



**Figura 7. Imágenes tomadas mediante FESEM de los films antes y después de recubrirlos mediante LbL con 10 bicapas. (a) PLLA sin recubrir. (b) PLLA con recubrimiento de Gel/Alg. (c) PLLA con recubrimiento de CS/Chi. (d) PLLA con recubrimiento de CS/Gel.**

Cabe mencionar la importancia de filtrar las disoluciones de los polielectrolitos para optimizar la realización del protocolo de LbL, como se ha demostrado al observar la figura 8. En esta vemos como, tanto en la muestra recubierta con CS/Chi (figura 8, a) o en la de Gel/Alg (figura 8, c), las disoluciones sin ser filtradas hicieron que el recubrimiento tuviese un aspecto granulado resultado de la falta de una completa disolución al ser polímeros de alto peso molecular. En cambio, las muestras filtradas de CS/Chi (figura 8, b) y Gel/Alg (figura 8, d) mostraron una superficie mucho más homogénea con ausencia de granulaciones, lo que demuestra la necesidad de filtrar las disoluciones de los polielectrolitos con filtros de 0,45 μm de nylon para lograr depositar capas más uniformes.



**Figura 8. Imágenes tomadas mediante FESEM de los films recubiertos con o sin filtrar. (a)** PLLA recubierto de CS/Chi sin filtrar. **(b)** PLLA con recubrimiento de CS/Chi filtrado. **(c)** PLLA con recubrimiento de Gel/Alg sin filtrar. **(d)** PLLA recubierto de Gel/Alg filtrado.

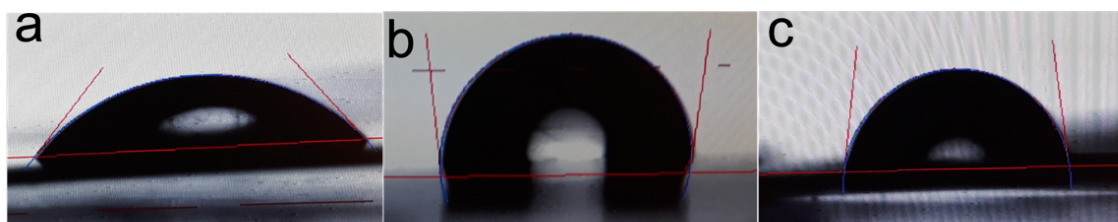
#### 4.2.2. ÁNGULO DE CONTACTO

Mediante la medida del ángulo de contacto se pudo analizar las distintas mojabilidades de cada tipo de recubrimiento. El estudio de este tipo de parámetro es importante para la caracterización de biomateriales, debido a su influencia en la adsorción proteica y en la adhesión celular sobre estos biomateriales (Esmailzadeh *et al.*, 2018). Así, valores más bajos del ángulo de contacto se correlacionan con mojabilidades mayores, mientras que ángulos más elevados con mojabilidades menores. En la figura 10 se muestran los resultados obtenidos para cada tipo de muestra y el análisis estadístico (Anexo 7.3) estudia la existencia de diferencias significativas entre estas.

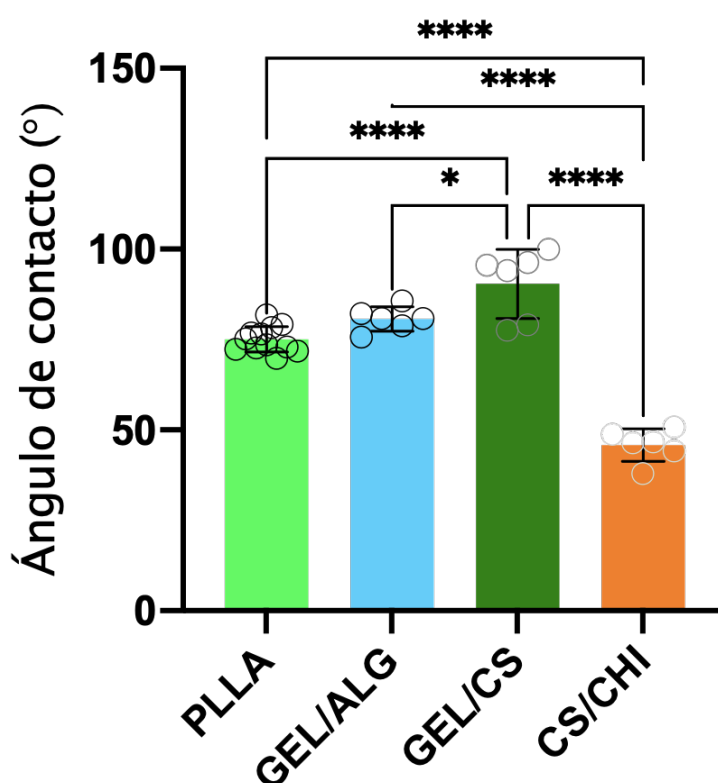
Como podemos observar en la figura 9, primeramente, existe una diferencia significativa entre la mojabilidad del PLLA respecto al recubrimiento CS/Chi (figura 9, a). Los distintos films de PLLA analizados presentan ángulos en torno a los 70°, mientras que las muestras recubiertas de CS/Chi presentan ángulos de 40°. Esto puede explicarse debido a la alta capacidad del CS para absorber H<sub>2</sub>O, por tanto, es un recubrimiento más hidrófilo y con un menor ángulo de contacto. En cambio, el recubrimiento Gel/Alg (figura 9, c) ha parecido ser significativamente más hidrófobo respecto al recubrimiento CS/Chi, ya que oscila ángulos de 80°, pero no presenta diferencias significativas respecto al PLLA. En cuanto a las muestras con recubrimiento CS/Gel (figura 9, b), que presentan gelatina en su superficie, los ángulos medidos se mueven en torno a los 90°, con mucha más variabilidad entre ellas comparadas con otro tipo de muestras. Esto puede ser debido a que la superficie del recubrimiento no es totalmente uniforme y por ello se genera una variabilidad entre las medidas tomadas. Cabe mencionar que, si la superficie del film no es del todo continua y existen discontinuidades en la topografía, puede aumentar el ángulo de contacto debido a que la gota de agua depositada está menos atraída por esta por la



presencia de aire retenido en la superficie, como puede haber sucedido en este recubrimiento, ya que presenta ángulos mayores significativamente comparados con el recubrimiento Gel/Alg, pese a presentar CS.



**Figura 9.** Fotografías de las gotas de agua Milli-Q depositadas y sus respectivos ángulos de contacto resultantes. Sobre CS/Chi (a), CS/Gel (b) y Gel/Alg (c).



**Figura 10.** Ángulos de contacto de muestras de 10 bicapas de PLLA sin recubrir (verde), PLLA con recubrimiento Gel/Alg (azul), PLLA con recubrimiento CS/Gel (verde oscuro) y PLLA con recubrimiento CS/Chi (naranja).

#### 4.2.3. ESPECTROSCOPÍA DE INFRARROJOS POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

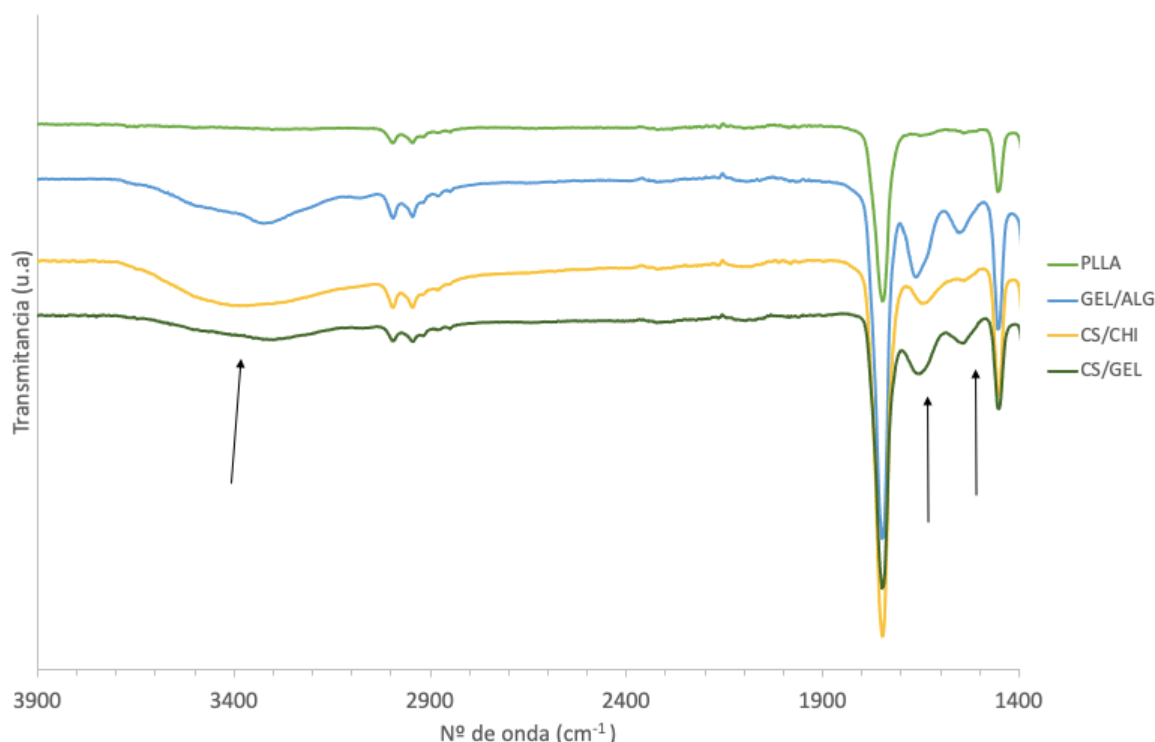
Por medio de la técnica FTIR se buscó obtener los espectros de transmitancia de luz infrarroja característicos de cada tipo de recubrimiento que permitiesen identificar la presencia de los grupos funcionales propios de estos polielectrolitos. Se obtuvieron y se compilaron los espectros de las muestras con 10 bicapas de los pares Gel/Alg, CS/Gel y CS/Chi (figura 11).

El espectro de PLLA, referido en Montañez *et al.* (2015), sirve como control para confirmar los picos característicos de cada recubrimiento, y por tanto su presencia. En las muestras con 10 bicapas se observa un pico en torno a  $3200\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$  en los tres tipos de recubrimiento, que es



propia de las vibraciones de los grupos funcionales hidroxilo -OH y amino -NH que son característicos de estos polielectrolitos. Este pico es notablemente más alto en los pares que tienen CS, porque absorbe más agua que los demás, como se ha mencionado en el apartado anterior 4.2.2 (Amrutkar and Gattani, 2009). Además, se puede observar cómo destaca otro pico alrededor de  $1600\text{ cm}^{-1}$  correspondiente a vibraciones del grupo carbonilo C=O en el recubrimiento Gel/Alg, como se explica en Saarai *et al.* (2013), a las vibraciones del grupo amida primaria CONH<sub>2</sub> en el recubrimiento de CS/Chi, analizado en Amrutkar and Gattani (2009), y a ambas en el recubrimiento CS/Gel, siendo más marcado este pico en este último recubrimiento. Encontramos otro pico a remarcar en torno a  $1500\text{ cm}^{-1}$  característico de amidas secundarias CONH en los pares que presentan gelatina, como se estudió en Saarai *et al.* (2013).

Previamente, se obtuvieron los espectros de las muestras de PLLA sin recubrir junto con aquellas con recubrimientos de Gel/Alg y CS/Chi de 5 bicapas (Anexo 7.4). En estas muestras, los picos anteriormente nombrados apenas se logran apreciar, siendo los espectros de los diferentes recubrimientos muy similares entre sí. Esta situación puede ser debida al escaso espesor de estas capas de polielectrolitos, comparadas con el grosor del film de PLLA usado como base, evitando que el espectrofotómetro captase de manera sensible las vibraciones de los grupos funcionales de los polielectrolitos. Por ello, no se pudo asegurar con certeza la presencia de los recubrimientos de 5 bicapas usando la técnica FTIR. En cambio, las muestras de 10 bicapas sí mostraron estos picos marcados. Debido al crecimiento exponencial de los recubrimientos, este número de bicapas fue suficientemente grueso para ser captado con sensibilidad por el espectrofotómetro y así se pudo afirmar la presencia de estos polielectrolitos sobre los films de PLLA.



**Figura 11. Espectro FTIR de muestras de 10 bicapas de PLLA sin recubrir (verde), PLLA con recubrimiento Gel/Alg (azul), PLLA con recubrimiento CS/Chi (amarillo) y PLLA con recubrimiento CS/Gel (verde oscuro). Las flechas indican las bandas a destacar.**

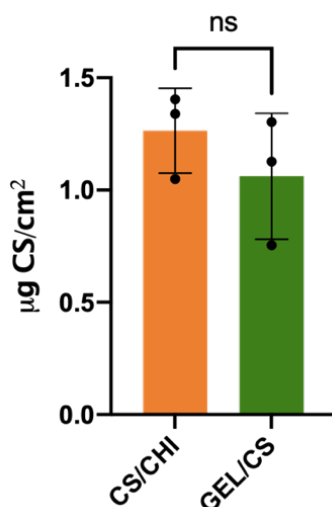
#### 4.2.4. CONCENTRACIONES GELATINA Y CONDROITÍN SULFATO

Usando distintos ensayos colorimétricos se estudió la cantidad de biomoléculas presentes en los recubrimientos. El ensayo B1000 Blyscan permitió obtener la cantidad total de CS que estaba presente en los films de PLLA recubiertos con los pares CS/Chi y CS/Gel con 10 bicapas. Asimismo, se estableció la cantidad de Gel que se hallaba en los soportes con recubrimientos Gel/Alg y CS/Gel con 10 bicapas empleando el kit BCA Protein Assay.

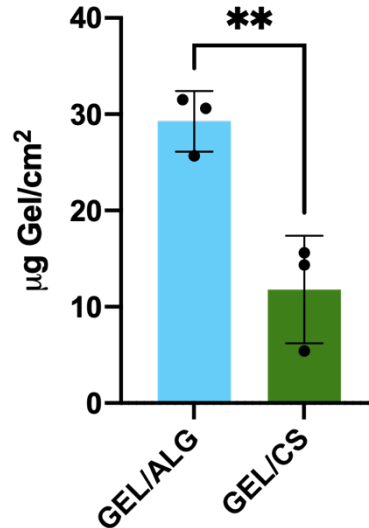
En la figura 12 podemos visualizar las diferencias en la cantidad del polielectrolito CS respecto a los dos recubrimientos en los que se presenta: CS/Chi y CS/Gel. Esta molécula se haya presente más abundantemente en el par CS/Chi, estando su concentración en torno a los  $1,26 \pm 0,18 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ; en cambio, el par CS/Gel presenta cantidades alrededor de los  $1,06 \pm 0,28 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . El análisis estadístico (Anexo 7.5) corroboró que no había diferencias significativas entre ambas concentraciones.

La figura 13 muestra también las diferencias en las cantidades de gelatina en los recubrimientos Gel/Alg y CS/Gel, siendo una diferencia significativa según el análisis estadístico (Anexo 7.5). La gelatina se haya notablemente más presente en el par Gel/Alg, con  $29,3 \pm 3,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , respecto al par CS/Gel que presenta una concentración de  $11,8 \pm 5,6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

Esta diferencia en el orden de magnitud de las concentraciones de gelatina, figura 12, y el condroitín sulfato, figura 13, puede deberse a que el ensayo anterior solamente reaccione con el CS superficial, mientras que este ensayo sí penetre en todos los recubrimientos en su totalidad, cuantificando la gelatina de todas las capas. Y por ello, se encuentre más cantidad de Gel en todas las capas del recubrimiento Gel/Alg que en el recubrimiento CS/Gel.



**Figura 12. Concentraciones de CS medidas en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en muestras de 10 bicapas de PLLA con recubrimiento CS/Chi (naranja) y PLLA con recubrimiento CS/Gel (verde oscuro).**

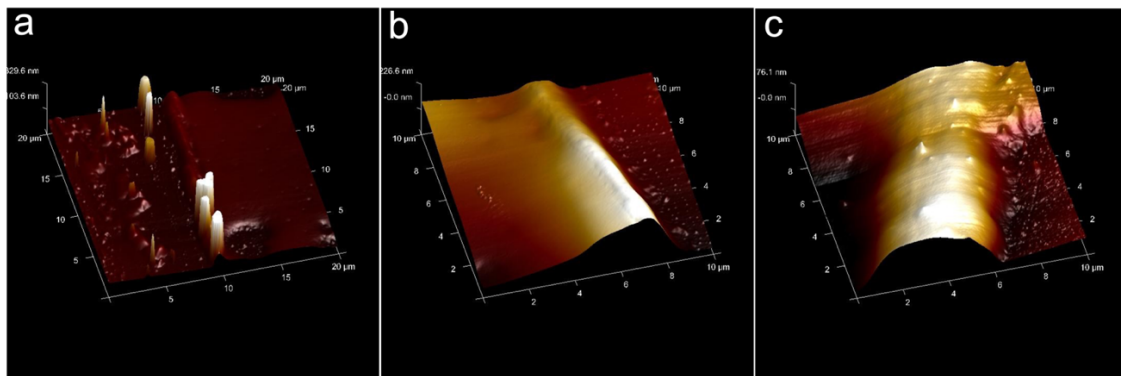


**Figura 13.** Concentraciones de Gel medidas en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  en muestras de 10 bicapas de PLLA con recubrimiento Gel/Alg (azul) y PLLA con recubrimiento CS/Gel (verde oscuro).

#### 4.2.5. AFM

Gracias al uso de la microscopía de fuerza atómica se puede realizar un estudio del grosor de cada recubrimiento. Se pudieron analizar muestras para el recubrimiento CS/Gel con 3, 7 y 10 bicapas preparadas sobre soportes de vidrio, representadas en 3D en la figura 14.

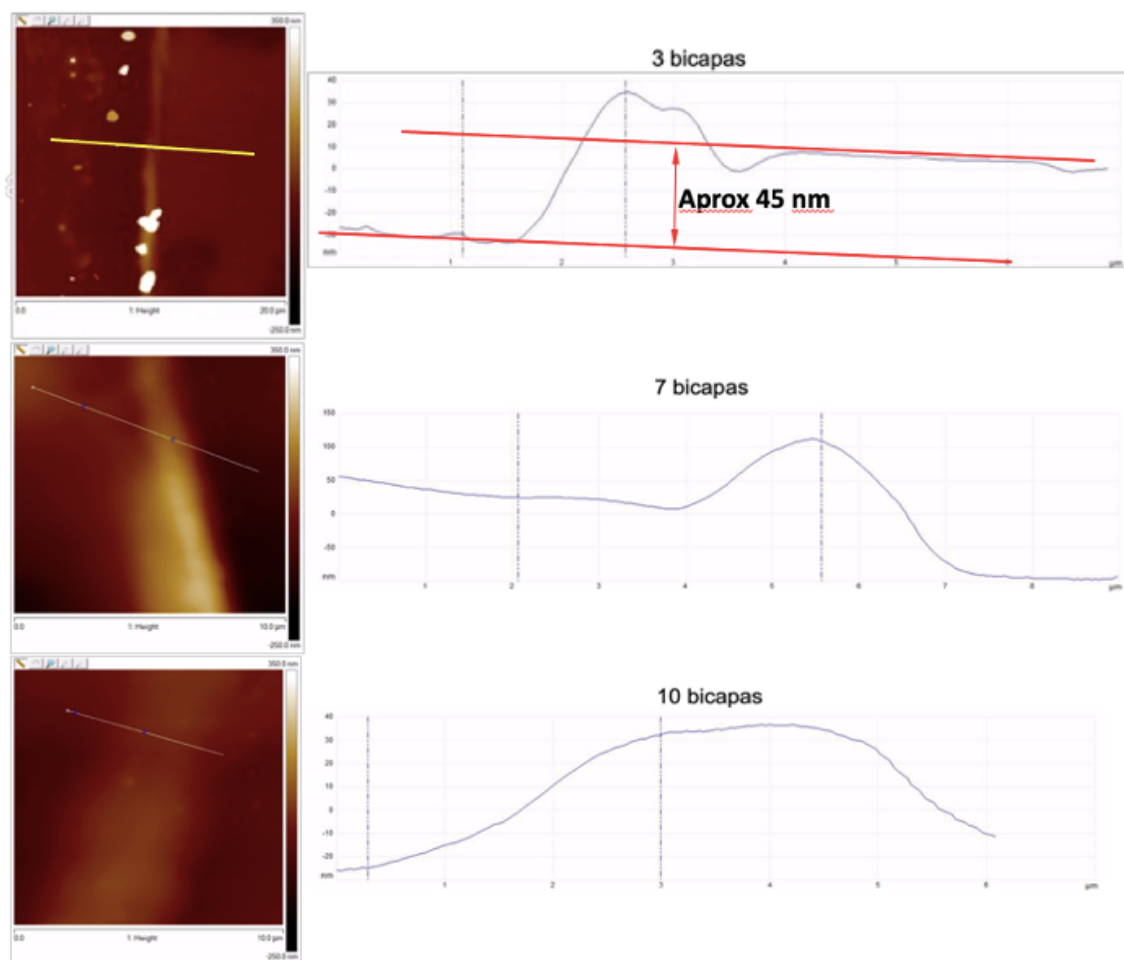
Como puede observarse, queda remarcada en cada imagen el corte vertical practicado en el recubrimiento que lo atraviesa hasta llegar al sustrato de vidrio. En la muestra de 3 bicapas (figura 14, a) se observa que el vidrio queda a la izquierda de la imagen, con una superficie más rugosa que el recubrimiento, que se encuentra a la derecha. Esto no ocurre en las muestras de 7 y 10 bicapas (figura 14, b y c), donde el vidrio queda a la derecha del corte y el recubrimiento a la izquierda. Una vez se da el corte, se genera en su proximidad una primera elevación consecuencia del arrastre del material que produce dicho corte, tras este cúmulo de material, se reduce la altura hasta alcanzarse la elevación real del recubrimiento. De esta manera, se puede percibir como la elevación propia del recubrimiento de 3 bicapas es menor comparada con el resto de las muestras, dado que presenta una tonalidad rojiza correspondiente a alturas reducidas. En cambio, las tonalidades más claras representan alturas mayores, como se representa en las muestras de 7 y 10 bicapas. La representación 3D de 7 bicapas muestra tonos más anaranjados, y la de 10 bicapas tonos más amarillentos, lo que confirma un incremento en el grosor del recubrimiento a medida que se depositan más bicapas.



**Figura 14. Representación 3D de las imágenes tomadas por AFM de las superficies del recubrimiento CS/Gel con 3 bicapas (a), 7 (b) y 10 (c).**

En la figura 15, las alturas mencionadas anteriormente quedan representadas en gráficas, mostrándose en cada una los perfiles de las líneas trazadas en las imágenes de la izquierda. Así, el soporte de vidrio alcanzado por el corte queda ubicado en alturas de -30 nm, mientras que tras este se encuentra el pico correspondiente al cúmulo del material. Posteriormente, se halla la elevación real del recubrimiento. Para la muestra de 3 bicapas, el grosor se encuentra entorno a 15 nm, siendo el grosor del orden de 45 nm. Para la muestra de 7 bicapas, el grosor se situaría alrededor de los 80 nm, corroborando el aumento de grosor a medida que se depositan bicapas. En el caso de 10 bicapas, esto no se pudo medir con precisión.

Estos datos se han obtenido únicamente de 3 muestras con diferente número de bicapas para el par CS/Gel, realizando un corte por muestra. Para lograr obtener un estudio clarificativo y robusto sobre el grosor de cada tipo de recubrimiento, se requiere la realización de estas mismas mediciones con los recubrimientos CS/Chi y Gel/Alg, además de realizar este estudio con más muestras y con mayor número de cortes en dichas muestras que permita el estudio de más perfiles de alturas.



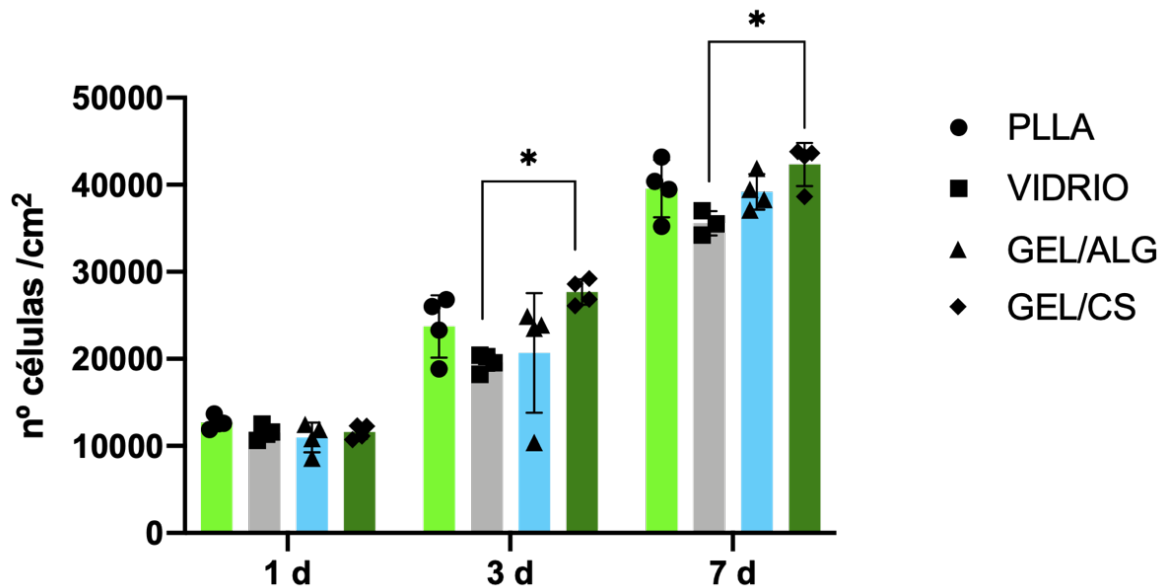
**Figura 15. Imágenes tomadas en 2D por AFM junto con sus correspondientes representaciones gráficas de las alturas propias del recubrimiento CS/Gel con 3 bicapas, 7 y 10. Los perfiles de las alturas fueron medidos en nm a través del trazo de una sección, señalizada en cada imagen.**

### 4.3. CULTIVOS CELULARES

Tras la caracterización física de los soportes planos, se llevaron a cabo cultivos *in vitro* con células madre mesenquimales humanas para estudiar el efecto producido por los distintos recubrimientos en términos de adhesión y proliferación. La adhesión celular sobre los diferentes soportes a 3 horas fue analizada, además de la proliferación de las bMSC a 1, 3 y 7 días. Las células madre mesenquimales humanas fueron cultivadas sobre dichos recubrimientos previamente cubiertos de fibronectina y en ausencia de suero para asegurar la directa interacción con esta molécula, en ausencia de interferencias con otras proteínas habitualmente presentes en el suero. La fibronectina fue empleada para ser reconocida por las bMSCs y para adherirse a estas, ya que ejerce de unión entre las moléculas del recubrimiento con las proteínas de la membrana celular. Fue necesaria su presencia, dado que mientras la gelatina presenta secuencias de unión celular RGD que las células son capaces de reconocer, los otros polielectrolitos carecen de estas y por ello requieren de la fibronectina para favorecer la adhesión celular. De esta manera, será el tipo de recubrimiento el que modifique en cada caso la cantidad y la conformación de la fibronectina que será mostrada a la célula, y por ello cada tipo de superficie ejercerá un efecto distinto en la adhesión celular.

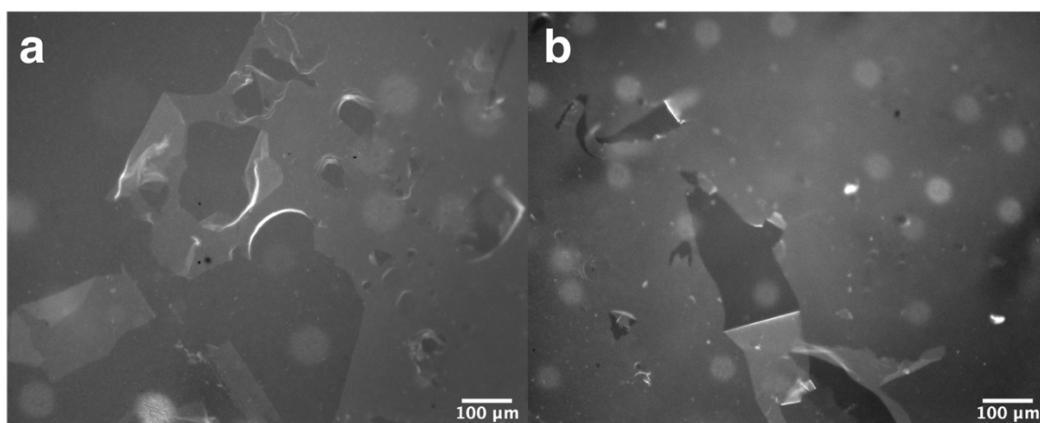
#### 4.3.1. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN

Este ensayo se realizó con la finalidad de determinar la proliferación celular para cada tipo de recubrimiento. En la figura 16 se pueden observar los resultados obtenidos para cada material (PLLA sin recubrimiento, Gel/Alg, CS/Gel y vidrio) en número de células/cm<sup>2</sup> para cada uno de los tiempos del ensayo (1, 3, 7 días). Se pudo apreciar un aumento en el número de células a medida que avanzaba el tiempo, lo que implica que las células proliferan en todos los soportes estudiados durante los tiempos establecidos. Se observan diferencias notables para el par CS/Gel respecto del control de vidrio, ya que puede verse como este recubrimiento estimula en mayor medida la proliferación de las células madre mesenquimales a partir del día 3, llegando a un número de células superior respecto del vidrio a día 7. Los estudios estadísticos realizados para cada día establecido (Anexo 7.7) corroboran la existencia de diferencias significativas entre este recubrimiento y el control de vidrio a días 3 y 7. Esto no ocurre con el recubrimiento Gel/Alg, que, aunque no provoca una disminución de la proliferación celular respecto a los controles PLLA y vidrio, tampoco estimula la viabilidad en mayor medida, no existiendo diferencias significativas y quedándose en valores similares a los recubrimientos control durante los tiempos estudiados. Respecto al par CS/Gel, quedó remarcado que es el recubrimiento sobre el que células proliferan en mayor medida.



**Figura 16. Proliferación celular medida mediante MTS sobre soportes de PLLA sin recubrir (verde), vidrio (gris) como control, PLLA con recubrimiento Gel/Alg (azul) y PLLA con recubrimiento CS/Gel (verde oscuro), a diferentes tiempos de cultivo. Se sembraron células madre mesenquimales humanas a 10000 células/cm<sup>2</sup>.**

Inicialmente se hizo un ensayo preliminar de proliferación (Anexo 7.6) a días 1, 4 y 6, con las muestras de PLLA sin recubrimiento, Gel/Alg, CS/Chi y CS/Gel. En dicho ensayo se pudo concluir que el recubrimiento CS/Chi era el menos adecuado para la proliferación celular, dado que el número de células/cm<sup>2</sup> era significativamente menor que los otros recubrimientos, incluso que el control de PLLA, como pudo verse a las 24 horas y a día 4. Esto se pudo deber a que, como puede observarse en la figura 17, este recubrimiento tiende a desprenderse del soporte por su alta capacidad de absorción de agua y por ello se dificulta la adhesión de las células sobre las capas despegadas. Por tanto, se decidió no incluir este par en el siguiente ensayo a realizar.



**Figura 17. Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a soportes de PLLA con recubrimiento CS/Chi.**

También cabe mencionar que, en este mismo ensayo, a día 6 en todas las muestras la proliferación celular no solo no había aumentado, sino que incluso había disminuido respecto del día 4. Lo que generó dudas sobre la razón de este resultado, pudiendo haber sido causado porque a día 6 aún no se había dado la siguiente fase de división celular, debido a que habían

llegado a confluencia y por ello la proliferación celular había cesado o a causa de algún error humano realizado durante el ensayo. Se decidió realizar un segundo ensayo, el mencionado anteriormente, incluyendo como control adicional el vidrio para asegurar la normal proliferación celular y unos resultados consistentes, y sin incluir el recubrimiento CS/Chi debido a su baja tasa de proliferación celular.

#### **4.3.2. INMUNOFLUORESCENCIA DE COMPONENTES CELULARES**

La finalidad de este ensayo fue la de evaluar la morfología de las células al cultivarse en cada tipo de recubrimiento (PLLA sin recubrimiento, PLLA recubierto de Gel/Alg, PLLA recubierto de CS/Gel y vidrio). El vidrio fue usado como control adicional para asegurar la normal adhesión de las células al sustrato y el par CS/Chi no fue estudiado debido a la baja adhesión celular en dicho recubrimiento, como se ha mencionado en el apartado 4.3.1.

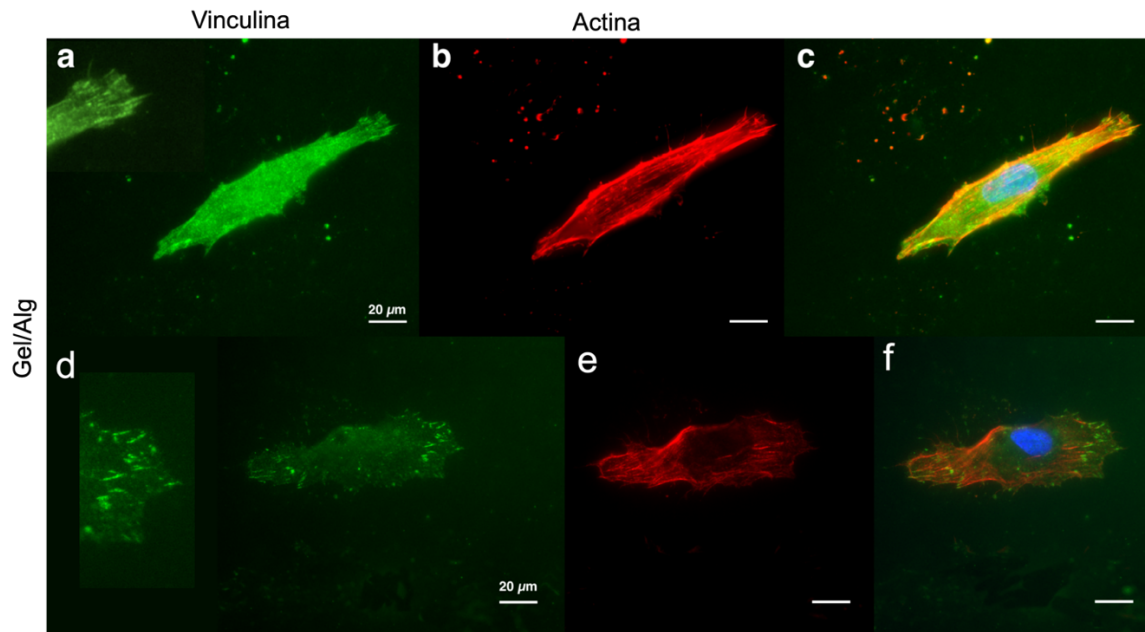
Evaluar la morfología de las células al ser cultivadas sobre un recubrimiento adquiere importancia debido a que esto permite analizar si los recubrimientos propuestos son adecuados para promover la adhesión celular y su posterior proliferación y diferenciación. Por ello, a través de inmunotinciones específicas del núcleo, del citoesqueleto de actina y del complejo proteico que forman las adhesiones focales donde está presente la vinculina, podemos observar la diferencia entre las células poco adheridas con una morfología esférica respecto de aquellas que presentan una morfología más aplanada y fusiforme, correspondiente a las células adheridas. Esto es debido a que, a medida que las células se van adhiriendo, van reorganizando sus filamentos de actina para expandir su citoesqueleto, y así lograr incrementar su área y establecer un mayor número de adhesiones focales en esa área que ha sido aumentada (Reilly and Engler, 2010). Las adhesiones focales están formadas por proteínas transmembrana, las integrinas, cuya función es la de anclar la célula a la matriz externa; a su vez estas integrinas están ancladas al citoesqueleto interno de la célula gracias a un complejo de proteínas, como es la vinculina. Formando así los complejos de adhesión que permiten el anclaje célula-matriz (Khalili and Ahmad, 2015).

Como puede observarse en las figuras expuestas a continuación, las fibras de actina se visualizan en rojo, siendo filamentos organizados por toda el área celular. La vinculina presente en las adhesiones focales se muestra en los exteriores de la célula en forma de finos hilos, observables en los acercamientos situados a la izquierda en color verde brillante.

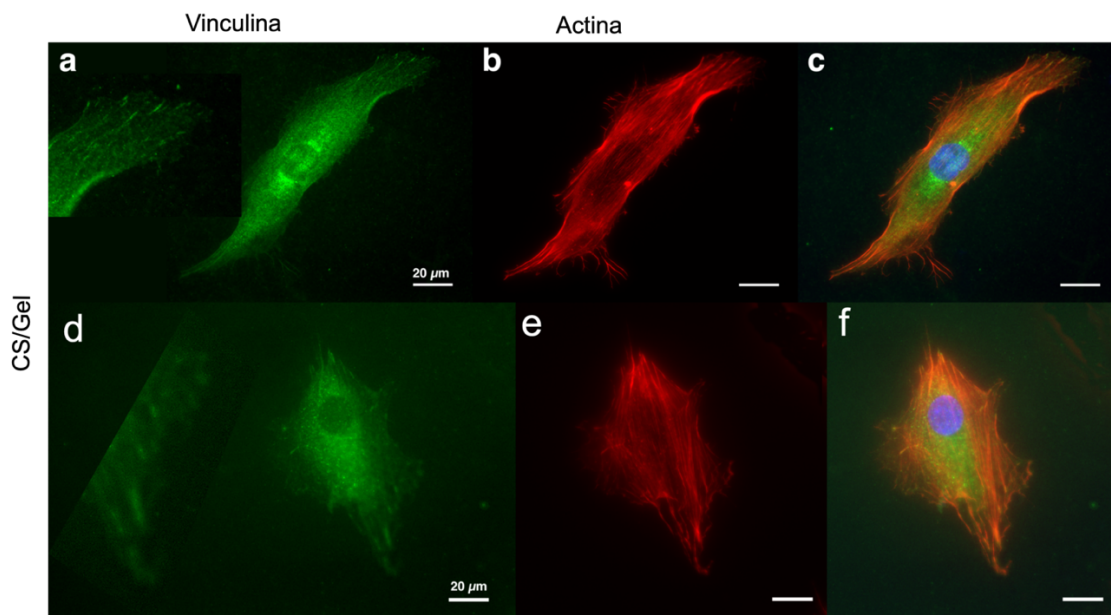
En la figura 18, se muestran las dos morfologías características de las células sembradas sobre el recubrimiento de Gel/Alg. Como se puede ver, se hallaron tanto células con morfología más ancha y redonda (figura 18, f) como morfologías más fibroblásticas y alargadas (figura 18, c). Mientras que para las células fusiformes es característico la presencia de adhesiones focales solo en las puntas de la célula, para las células esféricas más ensanchadas se presentan dichas adhesiones no solo en las puntas, si no alrededor del interior celular (figura 18, a y d).

Las células sembradas sobre recubrimientos de CS/Gel (figura 19) también presentaron variedad de morfologías, encontrando células más fusiformemente adheridas (figura 19, c) y otras con una morfología más redondeada (figura 19, f).





**Figura 18. Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a las diferentes inmunotinciones realizadas sobre muestra Gel/Alg.** Se sembraron células madre mesenquimales humanas a 10000 células/cm<sup>2</sup>. Se puede observar vinculina (verde) y actina (rojo), y la unión de ambas tinciones junto con los núcleos marcados con DAPI (azul).



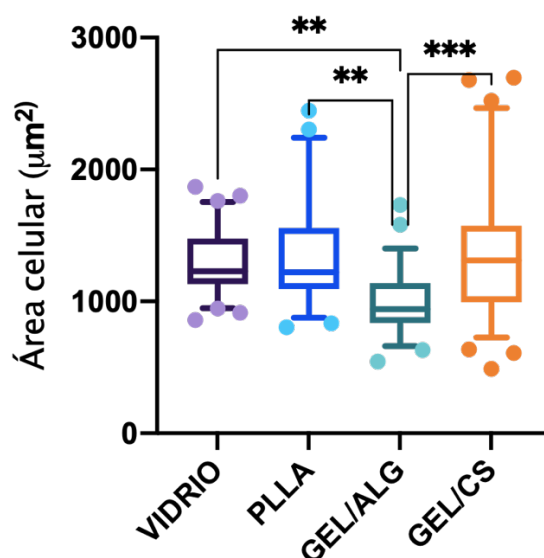
**Figura 19. Imágenes de microscopía de fluorescencia correspondientes a las diferentes inmunotinciones realizadas sobre muestra CS/Gel.** Se sembraron células madre mesenquimales humanas a 10000 células/cm<sup>2</sup>. Se puede observar vinculina (verde) y actina (rojo), y la unión de ambas tinciones junto con el marcaje de los núcleos con DAPI (azul).

Además de su visualización, se realizó una cuantificación tanto del área celular (figura 20) como de las circularidades (figura 21).

En cuanto a las áreas celulares, un área mayor correspondería con células expandidas, mientras que áreas menores corresponderían con células redondas y menos adheridas al sustrato. En la

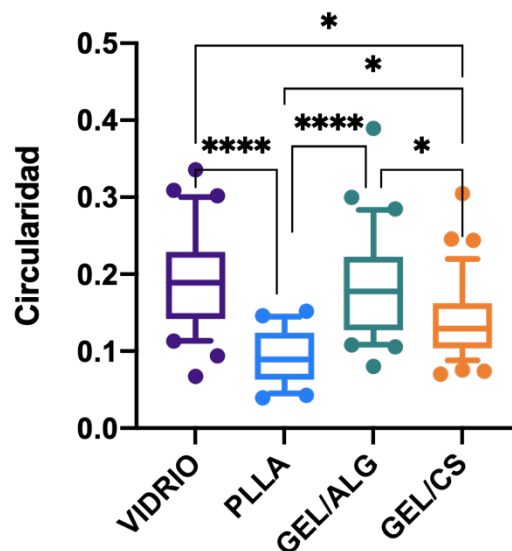


figura 20 se puede observar como el recubrimiento Gel/Alg presenta áreas celulares menores que CS/Gel mientras que este último presenta mayor número de células expandidas, esta diferencia significativa se puede deber a que la asociación de la gelatina con el CS favorece la adhesión y la extensión celular. Existe una gran dispersión en las áreas en el recubrimiento CS/Gel y, además, en los controles de PLLA, entendiéndose que en estas dos superficies se da variedad de formas. En cuanto al vidrio como control adicional, se puede observar como tiene menor rango de dispersión y presenta células expandidas con mayores áreas. Los estudios estadísticos realizados (Anexo 7.8) corroboran la existencia de diferencias significativas entre los distintos recubrimientos y los controles realizados.



**Figura 20. Box and whiskers (Percentil 10-90) de las áreas de las células adheridas a los diferentes soportes de vidrio como control, PLLA sin recubrir, PLLA con recubrimiento Gel/Alg y PLLA con recubrimiento CS/Gel. Medidas en  $\mu\text{m}^2$  a 3 horas.**

En la figura 21 expuesta a continuación se muestran las circularidades para cada tipo de recubrimiento realizado. La circularidad se mide en el intervalo  $[0,1]$ , siendo 1 un círculo perfecto. Como se ha mencionado anteriormente en el estudio de las áreas celulares, vemos una clara tendencia del recubrimiento CS/Gel de presentar células con menos circularidad y por ello más adheridas y fibroblásticas, mientras que Gel/Alg presenta valores de circularidad mayores lo que corrobora que las células sembradas sean más circulares y menos alargadas en comparación. Los estudios estadísticos realizados (Anexo 7.8) corroboran la existencia de diferencias significativas entre los controles y los recubrimientos. Los controles de PLLA presentaron las células con menor valor de circularidad, siendo las más alargadas, mientras que el control de vidrio presentó valores más elevados, siendo similares a los del recubrimiento Gel/Alg.



**Figura 21. Box and whiskers (Percentil 10-90) de las circularidades de las células adheridas a los diferentes soportes** de vidrio como control, PLLA sin recubrir, PLLA con recubrimiento Gel/Alg y PLLA con recubrimiento CS/Gel. Medidas entre 0 y 1, siendo 1 una circularidad perfecta.

El estudio realizado por Yang et al. (2009) analizó la respuesta de MSCs cultivadas en soporte plano de gelatina/alginate tanto in vitro como implantadas in vivo. Se vio como las MSCs fueron capaces de adherirse y proliferar adecuadamente en ambos ambientes y además su capacidad de renovación fue similar tanto en el cultivo in vitro como en la implantación in vivo de los scaffolds (Yang et al., 2009). En el estudio de Pacelli et al. (2018) también se estudió la respuesta de las MSCs al par gelatina/alginate, en este caso de adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs), demostrándose que gracias a la presencia de los motivos de adhesión RGD de la gelatina estas células se adhirieron y proliferaron apropiadamente, mostrando una morfología alargada en forma de huso característica de células con abundantes adhesiones focales (Pacelli et al., 2018). En nuestro estudio, esta morfología alargada estuvo presente en el par Gel/Alg, pero más abundantemente en el par CS/Gel, como demuestran las cuantificaciones del área celular y la circularidad.

En otro estudio realizado por Yan et al. (2017), se emplearon gelatina y condroitín sulfato adheridos por LbL a un soporte de alginate, con el fin de mejorar la falta de sitios adhesión celular del alginate y su poca rigidez mecánica. Los resultados fueron que las células empleadas, MC3T3-E1, fueron capaces de adherirse y proliferar gracias a los motivos RGD expuestos por la gelatina de la capa superior (Yan et al., 2017). En este trabajo se corroboró esta idea, dado que las bMSCs proliferaron y se adhirieron de manera adecuada sobre este el recubrimiento CS/Gel.

## 5. CONCLUSIONES

En último término, se resumen a continuación las conclusiones derivadas de este Trabajo Final de Grado:

1. Se ha logrado desarrollar un protocolo automatizado y escalable para la síntesis de soportes planos funcionalizados mediante el método layer-by-layer, programando un código para la impresora 3D Prusa i3 MK3S+. Así mismo, se han producido dichos soportes funcionalizados de ácido poli-L-láctico, exhibiendo las biomoléculas en estudio, gelatina o condroitín sulfato.
2. Se ha podido demostrar la presencia de los recubrimientos con la visualización de la topografía de su superficie mediante FESEM. Se ha logrado obtener espectros de transmitancia de luz infrarroja para cada recubrimiento y así se ha podido diferenciar la presencia de los grupos funcionales propios de estos.
3. Se han caracterizado físicamente los soportes sintetizados, midiendo tanto su mojabilidad, como las concentraciones de gelatina y condroitín sulfato presentes en los recubrimientos. Se ha observado que los soportes CS/Chi tienen la mayor hidrofiliidad y por ello tienden a despegarse del soporte, impidiendo la adhesión de las células sobre estas capas despegadas. En consecuencia, es el recubrimiento menos adecuado para la viabilidad celular.
4. Se ha medido la proliferación celular sobre los soportes a través de ensayos MTS. Gracias a este ensayo se ha podido observar que el par CS/Gel estimula en mayor medida la proliferación de las células madre mesenquimales, presentando diferencias significativas respecto al control de vidrio para los tiempos ensayados. También se ha logrado establecer que el par Gel/Alg no presenta diferencias significativas en cuanto a proliferación con los controles establecidos.
5. Se ha caracterizado la morfología celular y la presencia de adhesiones focales en las células madre mesenquimales adheridas en los soportes mediante las tinciones celulares DAPI, Actina y Vinculina. Se pudo afirmar una correcta adhesión celular asociada a los soportes Gel/Alg y CS/Gel a través de la existencia de células con una morfología de carácter fibroblástico. Gracias a la cuantificación de una mayor área celular y una menor circularidad, se asoció el recubrimiento CS/Gel como soporte más adecuado para la adhesión celular.

Por tanto, se puede concluir que los objetivos establecidos inicialmente se han llevado a cabo, al lograrse sintetizar soportes planos de ácido poli-L-láctico funcionalizados que presentan gelatina y condroitín sulfato en su superficie y al caracterizar tanto sus propiedades físicas como su efecto en la adhesión y proliferación temprana de células madre mesenquimales. Se ha logrado generar un soporte funcionalizado de Gel/CS con potencial para ser empleado en posteriores estudios de diferenciación espontánea.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALOTAIBI, H.; AL THAHER, Y.; PERNI, S.; PROKOPOVICH, P., 2018. Role of processing parameters on surface and wetting properties controlling the behaviour of layer-by-layer coated nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 36, pp.130-142.

AMRUTKAR, J.; GATTANI, S., 2009. Chitosan–Chondroitin Sulfate Based Matrix Tablets for Colon Specific Delivery of Indomethacin. *AAPS PharmSciTech*, 10(2), pp.670-677.

ASSUNÇÃO, M.; DEGHAN-BANIANI, D.; YIU, C.H.K.; SPÄTER, T.; BLOCKI, A., 2020. Cell-Derived Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(602009).

CAMPBELL, J.; VIKULINA, A., 2020. Layer-By-Layer Assemblies of Biopolymers: Build-Up, Mechanical Stability and Molecular Dynamics. *Polymers*, 12(9), p.1949.

CARVALHO, M.; SILVA, J.; CABRAL, J.; SILVA, C.; VASHISHTH, D., 2019. Cultured cell-derived extracellular matrices to enhance the osteogenic differentiation and angiogenic properties of human mesenchymal stem/stromal cells. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(9), pp.1544-1558.

CHEN, X.; DUSEVICH, V.; FENG, J.; MANOLAGAS, S.; JILKA, R., 2007. Extracellular Matrix Made by Bone Marrow Cells Facilitates Expansion of Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells and Prevents Their Differentiation Into Osteoblasts. *Journal of Bone and Mineral Research*, 22(12), pp.1943-1956.

CRiado, M.; REY, J.; MIJANGOS, C.; HERNÁNDEZ, R., 2016. Double-membrane thermoresponsive hydrogels from gelatin and chondroitin sulphate with enhanced mechanical properties. *RSC Advances*, 6(107), pp.105821-105826.

DA CÂMARA, P.; BALABAN, R.; HEDAYATI, M.; POPAT, K.; MARTINS, A.; KIPPER, M., 2019. Novel cationic tannin/glycosaminoglycan-based polyelectrolyte multilayers promote stem cells adhesion and proliferation. *RSC Advances*, 9(44), pp.25836-25846.

ESMAEILZADEH, P.; KÖWITSCH, A.; LIEDMANN, A.; MENZEL, M.; FUHRMANN, B.; SCHMIDT, G.; KLEHM, J.; GROTH, T., 2018. Stimuli-Responsive Multilayers Based on Thiolated Polysaccharides That Affect Fibroblast Cell Adhesion. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 10(10), pp.8507-8518.

FERNANDEZ, T. S.; FERNANDEZ, C. S., 2016. Mesenchymal Stem Cells: Biological Characteristics and Potential Clinical Applications for Haematopoietic Stem Cell Transplantation. In: M. Tomizawa, ed., *Pluripotent Stem Cells - From the Bench to the Clinic*. [online] IntechOpen. Available at: <<https://www.intechopen.com/books/pluripotent-stem-cells-from-the-bench-to-the-clinic/mesenchymal-stem-cells-biological-characteristics-and-potential-clinical-applications-for-haematopoi>> [Accessed 3 January 2021].

FERREIRA, A.; GENTILE, P.; TOUMPANIARI, S.; CIARDELLI, G.; BIRCH, M., 2016. Impact of Collagen/Heparin Multilayers for Regulating Bone Cellular Functions. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(44), pp.29923-29932.

FURUKAWA, T.; SATO, H.; MURAKAMI, R.; ZHANG, J.; DUAN, Y.; NODA, I.; OCHIAI, S.; OZAKI, Y., 2005. Structure, Dispersibility, and Crystallinity of Poly(hydroxybutyrate)/Poly(l-lactic acid)

Blends Studied by FT-IR Microspectroscopy and Differential Scanning Calorimetry. *Macromolecules*, 38 (15), pp.6445-6454.

IMBIR, G.; MZYK, A.; TREMBECKA-WÓJCIGA, K.; JASEK-GAJDA, E.; PLUTECKA, H.; SCHIRHAGL, R.; MAJOR, R., 2020. Polyelectrolyte Multilayer Films Modification with Ag and rGO Influences Platelets Activation and Aggregate Formation under In Vitro Blood Flow. *Nanomaterials*, 10(5), p.859.

KANGARI, P.; TALAEI-KHOZANI, T.; RAZEGHIAN-JAHROMI, I.; RAZMKHAH, M., 2020. Mesenchymal stem cells: amazing remedies for bone and cartilage defects. *Stem Cell Research & Therapy*, 11(1).

KEENEY, M.; JIANG, X.; YAMANE, M.; LEE, M.; GOODMAN, S.; YANG, F., 2015. Nanocoating for biomolecule delivery using layer-by-layer self-assembly. *Journal of Materials Chemistry B*, 3(45), pp.8757-8770.

KHALILI, A.; AHMAD, M., 2015. A Review of Cell Adhesion Studies for Biomedical and Biological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(8), pp.18149-18184.

MILLS, D. K.; LUO, Y.; ELUMALAI, A.; ESTEVE, S.; KARNIK, S.; YAO, S., 2020. Creating Structured Hydrogel Microenvironments for Regulating Stem Cell Differentiation. *Gels*, 6(4), p.47.

MONTAÑEZ, N.; PEÑA, D.; ESTUPIÑÁN, H., 2016. Respuesta dieléctrica y bioquímica de un recubrimiento PLA-PGA-HAp-Quitano-Colágeno sobre Ti6Al4V. *Ingeniare. Revista chilena de ingeniería*, 24(2), pp.215-227.

NIEMCZYK-SOCZYNSKA, B.; GRADYS, A.; SAIKIEWICZ, P., 2020. Hydrophilic Surface Functionalization of Electrospun Nanofibrous Scaffolds in Tissue Engineering. *Polymers*, 12(11), p.2636.

OLIVEIRA, S.; BISKER, G.; BAKH, N.; GIBBS, S.; LANDRY, M.; STRANO, M., 2015. Protein functionalized carbon nanomaterials for biomedical applications. *Carbon*, 95, pp.767-779.

PACELLI, S.; BASU, S.; BERKLAND, C.; WANG, J.; PAUL, A., 2018. Design of a Cytocompatible Hydrogel Coating to Modulate Properties of Ceramic-Based Scaffolds for Bone Repair. *Cellular and Molecular Bioengineering*, 11(3), pp.211-217.

PARK, H.; CHOI, B.; NGUYEN, J.; FAN, J.; SHAFI, S.; KLOKKEVOLD, P.; LEE, M., 2013. Anionic carbohydrate-containing chitosan scaffolds for bone regeneration. *Carbohydrate Polymers*, 97(2), pp.587-596.

RATANAVARAPORN, J.; CHUMA, N.; KANOKPANONT, S.; DAMRONGSAKKUL, S., 2018. Beads fabricated from alginate, hyaluronic acid, and gelatin using ionic crosslinking and layer-by-layer coating techniques for controlled release of gentamicin. *Journal of Applied Polymer Science*, 136(1), p.46893.

REILLY, G.; ENGLER, A., 2010. Intrinsic extracellular matrix properties regulate stem cell differentiation. *Journal of Biomechanics*, 43(1), pp.55-62.

RICHBOURG, N.; PEPPAS, N.; SIKAVITSAS, V., 2019. Tuning the biomimetic behavior of scaffolds for regenerative medicine through surface modifications. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 13(8), pp.1275-1293.

SAARAI, A.; KASPARKOVA, V.; SEDLACEK, T.; SAHA, P., 2013. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 18, pp.152-166.

SHENG, G., 2015. The developmental basis of mesenchymal stem/stromal cells (MSCs). *BMC Developmental Biology*, 15(1).

SILVA, J.; GEORGI, N.; COSTA, R.; SHER, P.; REIS, R.; VAN BLITTERAWIJK, C.; KARPERIEN, M.; MANO, J., 2013. Nanostructured 3D Constructs Based on Chitosan and Chondroitin Sulphate Multilayers for Cartilage Tissue Engineering. *PLoS ONE*, 8(2), p.e55451.

SILVA, J.; REIS, R.; MANO, J., 2016. Biomimetic Extracellular Environment Based on Natural Origin Polyelectrolyte Multilayers. *Small*, 12(32), pp.4308-4342.

ULLAH, I.; SUBBARAO, R.; RHO, G., 2015. Human mesenchymal stem cells - current trends and future prospective. *Bioscience Reports*, 35(2).

YAN, H.; CHEN, X.; FENG, M.; SHI, Z.; ZHANG, D.; LIN, Q., 2017. Layer-by-layer assembly of 3D alginate-chitosan-gelatin composite scaffold incorporating bacterial cellulose nanocrystals for bone tissue engineering. *Materials Letters*, 209, pp.492-496.

YANG, C.; FREI, H.; ROSSI, F. M.; BURT, H. M., 2009. The differential in vitro and in vivo responses of bone marrow stromal cells on novel porous gelatin-alginate scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 3(8), pp.601-614.

ZHANG, Y.; WU, D.; ZHAO, X.; PAKVASA, M.; TUCKER, A. B.; LUO, H.; QIN, K. H.; HU, D. A.; WANG, E. J.; LI, A. J.; ZHANG, M.; MAO, Y.; SABHARWAL, M.; HE, F.; NIU, C.; WANG, H.; HUANG, L.; SHI, D.; LIU, Q.; NI, N.; FU, K.; CHEN, C.; WAGSTAFF, W.; REID, R. R.; ATHIVIRAHAM, A.; HO, S.; LEE, M. J.; HYNES, K.; STRELZOW, J.; HE, T. C.; EL DAFRAWY, M., 2020. Stem Cell-Friendly Scaffold Biomaterials: Applications for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8(598607).

ZHOU, G.; NIEPEL, M.; SARETIA, S.; GROTH, T., 2015. Reducing the inflammatory responses of biomaterials by surface modification with glycosaminoglycan multilayers. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 104(2), pp.493-502.



### 7.3. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ÁNGULO DE CONTACTO

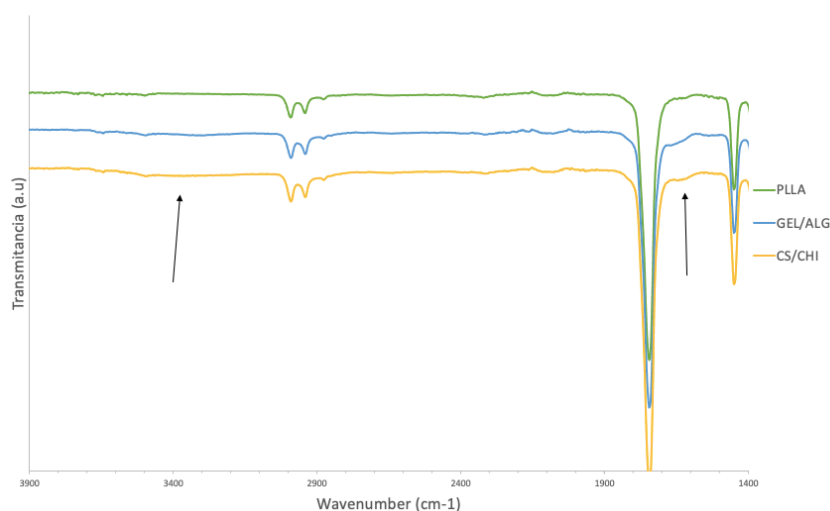
En la Tabla 2, se pueden observar los resultados del análisis estadístico realizado con los datos del ángulo de contacto para cada tipo de recubrimiento, referenciados en el apartado 4.2.2.

**Tabla 2. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9 del ángulo de contacto. En él se estudia si existen diferencias significativas entre los ángulos de contacto de los grupos de datos analizados.**

1	Number of families	1				
2	Number of comparisons per family	6				
3	Alpha	0.05				
4						
5	<b>Tukey's multiple comparisons test</b>	<b>Mean Diff.</b>	<b>95.00% CI of diff.</b>	<b>Below threshold?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
6	PLLA vs. GEL-ALG	-5.579	-12.96 to 1.803	No	ns	0.1883
7	PLLA vs. GEL-CS	-15.31	-22.69 to -7.931	Yes	****	<0.0001
8	PLLA vs. CS-CHI	29.25	21.87 to 36.64	Yes	****	<0.0001
9	GEL-ALG vs. GEL-CS	-9.733	-18.26 to -1.210	Yes	*	0.0208
10	GEL-ALG vs. CS-CHI	34.83	26.31 to 43.36	Yes	****	<0.0001
11	GEL-CS vs. CS-CHI	44.57	36.04 to 53.09	Yes	****	<0.0001

### 7.4. FTIR DE 5 BICAPAS

Con la técnica FTIR se obtuvieron inicialmente los espectros de las muestras de PLLA sin recubrir junto con aquellas con recubrimientos de Gel/Alg y Cs/Chi de 5 bicapas, que se muestran a continuación en la figura 24. Dichos espectros fueron compilados y desplazados por el eje Y para permitir una mejor visualización de cada uno. Los resultados quedan discutidos en el apartado 4.2.3.



**Figura 24. Espectro FTIR de muestras de 5 bicapas de PLLA sin recubrir (verde), PLLA con recubrimiento Gel/Alg (azul) y PLLA con recubrimiento CS/CHI (amarillo). Las flechas indican las bandas a destacar.**

### 7.5. RESULTADOS DEL ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LAS CONCENTRACIONES DE GEL Y CS



En las Tablas 3 y 4, que se muestran a continuación, se recogen los resultados de los análisis estadísticos realizados sobre las concentraciones de gelatina y condroitín sulfato, referenciados en el apartado 4.2.4.

**Tabla 3. Resultados del análisis estadístico t test desarrollado por el software GraphPad Prism 9 de la concentración de gelatina.** En él se estudia si existen diferencias significativas entre los dos grupos de datos analizados: la concentración de gelatina en CS/Gel y Gel/Alg.

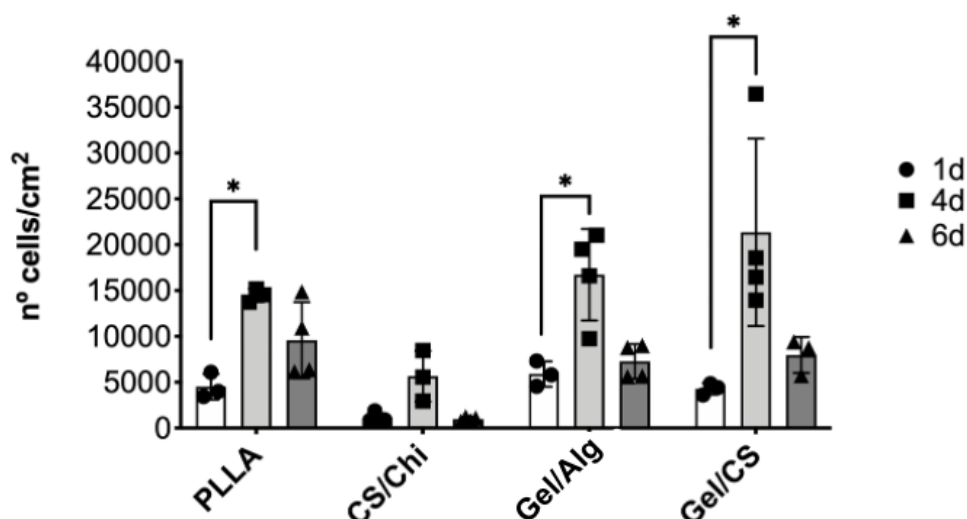
3	Column B	GEL/CS
4	vs.	vs.
5	Column A	GEL/ALG
6		
7	<b>Unpaired t test</b>	
8	P value	0.0091
9	P value summary	**
10	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
11	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
12	t, df	t=4.731, df=4

**Tabla 4. Resultados del análisis estadístico de t test desarrollado por el software GraphPad Prism 9 de la concentración de condroitín sulfato.** En él se estudia si existen diferencias significativas entre los dos grupos de datos analizados: la concentración de condroitín sulfato en CS/Gel y CS/Chi.

3	Column B	GEL/CS
4	vs.	vs.
5	Column A	CS/CHI
6		
7	<b>Unpaired t test</b>	
8	P value	0.3576
9	P value summary	ns
10	Significantly different (P < 0.05)?	No
11	One- or two-tailed P value?	Two-tailed
12	t, df	t=1.039, df=4

## 7.6. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN MTS PRELIMINAR

Este ensayo queda referenciado y explicado en el apartado 4.3.1. En él, como puede observarse en la figura 25, se muestran los datos de proliferación celular en número de células/cm<sup>2</sup> respecto a cada recubrimiento en los días estudiados, 1,4 y 6. Existen diferencias significativas entre las proliferaciones a 24 horas y 4 días en todas las muestras, excepto para CS/Chi; mientras que a día 6 los valores disminuyen drásticamente en todos los casos.



**Figura 25. Proliferación celular medida mediante MTS sobre soportes de PLLA sin recubrir, PLLA con recubrimiento CS/Chi, PLLA con recubrimiento Gel/Alg y PLLA con recubrimiento CS/Gel, a diferentes tiempos de cultivo. Se sembraron células madre mesenquimales humanas a 5000 células/cm².**

## 7.7. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS ENSAYOS DE MTS

Se muestran, tras esta explicación, las Tablas 5, 6 y 7 que recogen los resultados de los análisis estadísticos producidos de los datos de los ensayos MTS de cada día estudiado, referenciados en el apartado 4.3.1.

**Tabla 5. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos del MTS a 24 horas. Se muestran si existen diferencias significativas entre las proliferaciones de las distintas muestras estudiadas.**

1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff.	Significant?	Summary	Adjusted P Value
6	PLLA vs. Vidrio	6.250	No	ns	0.3803
7	PLLA vs. Gel-Alg	6.750	No	ns	0.2697
8	PLLA vs. Gel-CS	6.000	No	ns	0.4482
9	Vidrio vs. Gel-Alg	0.5000	No	ns	>0.9999
10	Vidrio vs. Gel-CS	-0.2500	No	ns	>0.9999
11	Gel-Alg vs. Gel-CS	-0.7500	No	ns	>0.9999

**Tabla 6. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos del MTS a 3 días. Se muestran si existen diferencias significativas entre las proliferaciones de las distintas muestras estudiadas.**

1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
6	PLLA vs. Vidrio	4.250	No	ns	>0.9999
7	PLLA vs. Gel-Alg	1.500	No	ns	>0.9999
8	PLLA vs. Gel-CS	-5.750	No	ns	0.5258
9	Vidrio vs. Gel-Alg	-2.750	No	ns	>0.9999
10	Vidrio vs. Gel-CS	-10.00	Yes	*	0.0178
11	Gel-Alg vs. Gel-CS	-7.250	No	ns	0.1876

**Tabla 7. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos del MTS a 7 días. Se muestran si existen diferencias significativas entre las proliferaciones de las distintas muestras estudiadas.**

1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
6	PLLA vs. Vidrio	5.583	No	ns	0.6128
7	PLLA vs. Gel-Alg	0.7500	No	ns	>0.9999
8	PLLA vs. Gel-CS	-4.000	No	ns	>0.9999
9	Vidrio vs. Gel-Alg	-4.833	No	ns	0.9423
10	Vidrio vs. Gel-CS	-9.583	Yes	*	0.0301
11	Gel-Alg vs. Gel-CS	-4.750	No	ns	0.7985

## 7.8. RESULTADOS DE LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LAS ÁREAS Y CIRCULARIDADES CELULARES

A continuación, se presentan las Tablas 8 y 9 que muestran los resultados de los análisis estadísticos obtenidos a partir de los datos de las áreas y de las circularidades, respectivamente, que se explican en el apartado 4.3.2.

**Tabla 8. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos de las áreas celulares de cada muestra. Se muestran si existen diferencias significativas entre las distintas muestras estudiadas.**

1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
6	VIDRIO vs. PLLA	-0.4696	No	ns	>0.9999
7	VIDRIO vs. GEL-ALG	31.61	Yes	**	0.0021
8	VIDRIO vs. GEL-CS	-1.143	No	ns	>0.9999
9	PLLA vs. GEL-ALG	32.08	Yes	**	0.0042
10	PLLA vs. GEL-CS	-0.6733	No	ns	>0.9999
11	GEL-ALG vs. GEL-CS	-32.75	Yes	***	0.0007

**Tabla 9. Resultados del análisis estadístico de comparaciones múltiples desarrollado por el software GraphPad Prism 9. Realizado con los datos de las circularidades celulares. Se muestran si existen diferencias significativas entre las distintas muestras estudiadas.**

1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	6			
3	Alpha	0.05			
4					
5	<b>Dunn's multiple comparisons test</b>	<b>Mean rank diff.</b>	<b>Significant?</b>	<b>Summary</b>	<b>Adjusted P Value</b>
6	VIDRIO vs. PLLA	54.88	Yes	****	<0.0001
7	VIDRIO vs. GEL-ALG	3.433	No	ns	>0.9999
8	VIDRIO vs. GEL-CS	26.74	Yes	*	0.0110
9	PLLA vs. GEL-ALG	-51.45	Yes	****	<0.0001
10	PLLA vs. GEL-CS	-28.14	Yes	*	0.0125
11	GEL-ALG vs. GEL-CS	23.31	Yes	*	0.0397